



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES POLYPEPTIDS
AUS YOSHIDA-ASCITES-ZELLEN MIT BINDUNGSAKTIVITÄT
FÜR ADENIN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München

vorgelegt von
Peter Spitzauer
aus
Neuburg/Donau

1972



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hannig
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Autrum
- Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1972

Die vorstehende Arbeit wurde durch die Förderung der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Berlin (HAW) und der
HAW-Gruppe für Angewandte Wissenschaften Berlin (HAW-AGW) und unter
Führung von Prof. Dr. habil. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.

Meiner Mutter
Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.
Die vorstehende Arbeit wurde durch die Förderung der Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Berlin (HAW) und der HAW-Gruppe für Angewandte Wissenschaften Berlin (HAW-AGW) und unter
Führung von Prof. Dr. habil. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.

Meiner Mutter

Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.
Die vorstehende Arbeit wurde durch die Förderung der Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Berlin (HAW) und der HAW-Gruppe für Angewandte Wissenschaften Berlin (HAW-AGW) und unter
Führung von Prof. Dr. habil. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.

Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.
Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.
Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.
Meiner Mutter, Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h. Dr. h. c. h.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. K. Hannig in der Zeit vom Mai 1967 bis
Januar 1972 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Leder-
forschung in München durchgeführt.

Danken möchte ich
Herrn Prof. Dr. K. H a n n i g
für sein Wohlwollen und die großzügige Förderung dieser
Arbeit,
Herrn Dr. A. S c h w e i g e r
für Anleitung und anregende Diskussion.

Herrn Prof. Dr. H.-J. A u t r u m
danke ich für sein Entgegenkommen, diese Arbeit außerhalb
seines Institutes am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und
Lederforschung durchführen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Seite

EINLEITUNG	1
1) Einteilung der Proteine	1
2) Funktion von Polypeptiden	2
3) Polypeptide mit hoher Absorption bei 260 nm	4
AUFGABENSTELLUNG	7
ERGEBNISSE	8
I. Auswahl und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials (Yoshida-Ascites-Zellen)	8
II. Versuche zur Isolierung von Polypeptiden mit Bindungsaktivität für Nukleinsäuren oder deren Vorstufen aus Yoshida-Ascites-Zellen	9
1) Waschen und Homogenisieren der Zellen	9
2) Isolierung der Zellkerne und Extraktion von Kernsaftproteinen (Nukleosol)	10
3) Polyacrylamid-Gel-Diskelektrophorese von Kernsaftproteinen	13
4) Vergleich der Nukleosol-Proteine mit einer "Peptid"-Fraktion des Cytosols in der split-gel-Diskelektrophorese	14
5) Auftrennung der "Polypeptid"-Fraktion aus dem Gesamthomogenat mit der trägerfreien Elektrophorese	16
6) Isolierung von Polypeptiden durch Gelfiltration	20
III. Charakterisierung der Polypeptide	22
1) Prüfung der Homogenität der Bio-Gel-Säulenfraktion durch Diskelektrophorese	22
2) Aufnahme des UV-Spektrums	23
3) Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Natrium-dodecylsulfat-Methode	25
4) Bestimmung des Isoelektrischen Punktes in der LKB-Säule und im Polyacrylamid-Stäbchen	28

	Seite
5) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	31
6) Aminosäureanalyse	32
7) Markierung der Polypeptide mit radioaktiven Nukleinsäure(-vorstufen)	34
a) Prüfung auf Bindungsaktivität für RNS in vitro	34
b) Bindung von Pyrimidin- bzw. Purinbasen in vivo	34
c) Isotopenverdünnungsversuch	39
d) Untersuchungen zur Natur der Bindung Protein - organische Base	42
IV. Versuche zur Lokalisierung des isolierten Polypeptids in weiteren nukleinsäurehaltigen Zellkompartimenten	44
V. Vergleich mit einem Leberpolypeptid: Isolierung - Elektrophoretisches Verhalten - Molekulargewicht - Aminosäureanalyse	45
DISKUSSION	
1) Nukleinsäure-bindende Proteine	49
2) Isolierung der Polypeptide P ₁ und P ₂	50
3) Eigenschaften und mögliche Funktionen der isolierten Polypeptide P ₁ und P ₂	53
MATERIAL UND METHODEN	
1) Gewinnung von Yoshida-Ascites-Zellen	60
2) Präparation von Zellorganellen aus Yoshida-Asciteszellen bzw. Rattenleber	60
a) Isolierung von Ascites-Kernen	61
b) Leber-Kernen	62
c) "Mikrosomenfraktion" und freien Ribosomen aus Ascites-Zellen	64
3) Präparation einer "Polypeptidfraktion" aus Zellorganellen und Cytosol von Yoshida-Ascites und Rattenleber	66

4) Auftrennung der durch Acetonfällung gewonnenen rohen "Peptidfraktion" in der trägerfreien Elektro- phorese	67
5) Gelfiltration an Bio-Gel P10-Material	68
6) Analytische Diskelektrophorese	69
7) Split-gel-Methode (Diskelektrophorese)	71
8) Molekulargewichtsbestimmung mit der SDS-Methode im PAA-Gel	72
a) eigenes System	72
b) System nach Swank-Munkres	73
9) Bestimmung des isoelektrischen Punkts	74
a) in der LKB-Säule	74
b) im PAA-Gel	75
10) Aminosäureanalyse	76
11) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	77
12) RNS-Bindung an isolierte Polypeptide in vitro	78
13) Bindung von Nukleinsäurevorstufen an Polypeptide in vivo	79
a) Orotsäure	79
b) Guanin bzw. Adenin	80
c) Isotopenverdünnungsversuch	81
d) Autoradiografie bei diskelektrophoretischen Verfahren	81
14) Elektronenmikroskopie	82
15) Proteinbestimmung	83
ZUSAMMENFASSUNG	84
LITERATURVERZEICHNIS	86

Häufig verwendete Abkürzungen

PAA	= <u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mid
MG	= Molekulargewicht
ER	= Endoplasmatisches Retikulum
SDS	= Natrium-dodecyl-sulfat
TCA	= Trichlor-essigsäure
PCA	= <u>P</u> er <u>ch</u> lor <u>sä</u> ure
VAP	= Trägerfreie Elektrophoreseapparatur nach Hannig
IEP	= Iso-elektrischer Punkt
TEMED	= Tetramethyläthylendiamin
Bis	= N,N'-Methylenbisacrylamid
Tris	= Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
UV-	= Ultraviolett
cts/min	= radioaktive Zerfallsrate
Na-EDTA	= Äthylendiamintetraacetat-Natriumsalz
c	= Curie - Einheit der Radioaktivität
P ₁ /P ₂	= Polypeptidfraktionen aus Yoshida-Ascites-Zellen
Ext. ₂₆₀	= Extinktion bei 260 nm
P ₁ '	= Polypeptid aus Rattenleber

EINLEITUNG

1) Einteilung der Proteine

Drei große Klassen organischer Verbindungen sind Grundbausteine der belebten Natur: Kohlenhydrate, Nukleinsäuren und Proteine.

Aus einer Vielzahl von Aufgaben, die sie erfüllen, seien nur einige wesentliche herausgegriffen: **K o h l e n h y d r a t e** sind uns als Speichersubstanzen bekannt, z.B. in Form von Stärke und Glycogen, aber auch als Gerüstsubstanzen, wie sie in der Cellulose der pflanzlichen Zellwand oder im Chitin der Arthropoden vorliegen. **N u k l e i n s ä u r e n** fungieren als Träger der Erbinformation: Die DNS der Chromosomen wird als identische "Vollkopie" bei einer Zellteilung auf die Tochterzelle übertragen, oder als "Teilkopie" in die Form der komplementär aufgebauten m-RNA übersetzt ("Transkription"), nach deren Basensequenz die Ribosomen die Aminosäureketten der Eiweißkörper aufbauen ("Translation"). Die **P r o t e i n e** selbst wiederum steuern und katalysieren diese Vorgänge neben einer großen Anzahl von weiteren Synthese- und Abbauvorgängen in der Zelle, für die sie Reaktionspartner und Energie in geeigneter Form bereitstellen.

Nach heutigem Wissen ist die zuletzt genannte Stoffgruppe die umfangreichste und vielfältigste, sodaß es schwerfällt, eine sinnvolle Unterteilung zu treffen. So unterscheidet man faserförmige "**S k l e r o p r o t e i n e**", die - vergleichbar den Kohlenhydraten - Stütz- und Gerüstsubstanzen darstellen, und globuläre oder "**Sphäroproteine**": mehr oder weniger kugelförmige Eiweißkörper, die nach Aminosäurezusammensetzung und Löslichkeitsverhalten noch in **H i s t o n e**, **A l b u m i n e** und **G l o b u l i n e** unterteilt werden. In der zuletzt genannten Gruppe finden sich die enzymatisch wirksamen Proteine.

Eine weitere Differenzierung erlaubt noch die mehr oder weniger willkürliche Unterscheidung von "**P r o t e i n e n**" - mit einem Molekulargewicht von 10.000 bis zu Millionen - und "**P o l y p e p t i d e n**", deren Molekulargewicht unter

10.000 liegt; eine scharfe bzw. grundlegende Trennung der beiden Begriffe ist jedoch nicht angebracht.

2) Funktion von Polypeptiden

Die Aminosäuresequenz ("Primärstruktur") bestimmt die räumliche Struktur und zugleich die Funktion eines derartigen Kettenmoleküls: die Ausbildung faltblatt- oder schraubenartiger " α -helix"-Bereiche ("Sekundärstruktur") und ihre Anordnung zueinander in Form einer komplizierten "Tertiärstruktur", die wiederum durch -S-S-Brücken zwischen Cysteinresten, Wasserstoffbrücken, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen benachbarten Atomgruppierungen stabilisiert wird.

Bei durchschnittlich großen Proteinen können meist eine oder mehrere Aminosäuren gegen andere ausgetauscht sein, ohne daß daraus eine Änderung der Raumstruktur oder eine stärkere Beeinträchtigung der Funktion resultieren muß. Dies zeigt u.a. das bekannte Beispiel des Hämoglobins: Wird die Aminosäure Glutamin in Position 6 der β -Kette (entsprechend dem Normalhämoglobin A) durch Lysin ersetzt (Hämoglobin C, verursacht durch eine Mutation), so lassen sich bei diesem "pathologischen" Fall nur geringfügige klinische Symptome nachweisen.

Anders liegen die Verhältnisse bei den niedermolekularen Polypeptiden: Dies zeigt sich deutlich am Beispiel Ocytocin-Vasopressin: Beide Hypophysenhormone weisen die gleiche Aminosäureanzahl und prinzipiell die gleiche Sequenz auf - mit der Einschränkung, daß in Position 3 und 8 unterschiedliche Aminosäuren im Molekül eingebaut sind. Hier besteht nicht mehr nur ein gradueller Unterschied in der Funktion beider Substanzen wie bei Hämoglobin A und C - in diesem Falle haben die beiden so ähnlich aufgebauten Hormone gänzlich verschiedenartige Wirkung. Ein derartiger Sachverhalt läßt sich verstehen, wenn man die räumliche Struktur des Gesamtmoleküls betrachtet: Durch den Austausch einer bzw. weniger Aminosäuren kommen gegenüber dem ursprünglichen Zustand ganz unterschiedliche Atomgruppierungen in nächste Nachbarschaft zueinander, deren

Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte u.U. zu einer Neuordnung der Aminosäureketten und damit der Tertiärstruktur führen können (wie z.B. durch den Einbau von Prolin, das die Ausbildung einer α -Helix stört).

Bei geringer Molekülgröße wirkt sich also eine geringfügig veränderte Primärstruktur relativ stärker auf die räumliche Struktur und die Funktion von Eiweißkörpern aus als bei hohem Molekulargewicht. Niedermolekulare Proteine erscheinen demnach geradezu als prädestiniert, als kleine und wenig Aminosäurematerial erfordernde Moleküle jeweils spezifische Aufgaben "ökonomisch" zu erfüllen. So überrascht es nicht, daß in der Gruppe der Polypeptide in den letzten Jahren viele interessante Wirkstoffe aufgefunden worden sind, die jeweils eine wichtige Rolle bei Regulationsprozessen spielen.

Nur einige Beispiele seien in diesem Zusammenhang aufgeführt:

In den Kernen von Fischespermien wurden die stark basischen Protamine aufgefunden: Vermutlich treten sie als Polykationen mit den Nukleinsäuren (Polyanionen) zusammen und ermöglichen deren dichte Packung in den Samenzellen (KARLSON, 1970).

Auch antibiotisch wirksame Substanzen wurden aufgefunden: Bacitracin und Gramicidin - ein Ringpeptid aus 10 Aminosäuren mit 2 Phenylalaninresten, die hier in der selten vorkommenden D-Konfiguration auftreten.

JENTSCH (1972) gelang es, aus Bienengift Phospholipase A zu isolieren, eine Phosphatidacylhydrolase mit einem Molekulargewicht von 10.900 - 30 mal aktiver als die Phospholipase A aus Schlangengift von *Crotalus terr. terr.* (Dieser Befund kam überraschend, da lange Zeit angenommen worden war, daß derart kleine Moleküle keine enzymatische Wirkung entfalten können).

Aus einer Reihe von Peptidhormonen seien neben den bisher angeführten (s.o.) nur noch Corticotropin (ACTH) sowie die Pankreashormone Insulin und Glucagon erwähnt, zwei antagonistisch wirkende Hormone des Glucosestoffwechsels.

Untersuchungen über die Wirkungsweise des Glucagons haben (u.a.) uns Einblick in die steuernde und regulatorische Funktion der Hormone verschafft (KARLSON, 1961; KARLSON und SEKERIS 1966). Dabei zeigte sich, daß eine Primärwirkung in der Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes besteht, der manchmal Teil des Adenylat-Zyklase-Systems in der Zellmembran zu sein scheint, das ATP in zyklisches AMP umwandelt. Dieses AMP vermag in zahlreiche Stoffwechselprozesse einzugreifen, angefangen von einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran bis zur Stimulation enzymatischer Vorgänge.

Eine weitere Primärwirkung vieler Hormone besteht in der Induktion von Enzymen selbst: Durch die Bildung eines Hormon-Repressor-Komplexes, der sich vom Genort ablöst, wird die bisher blockierte DNS freigelegt, die Synthese von messenger-RNA kann anlaufen, und an den Ribosomen wird schließlich das Enzymprotein aufgebaut.

3) Polypeptide mit hoher Absorption bei 260 nm

Eine weitere, wenig bekannte und untersuchte Funktion gewisser Polypeptide der Zelle ließ sich aus Befunden von HERP et al. (1970) ableiten. Die Autoren entdeckten in "rohen Peptidultrafiltraten" aus Rattenleber hohe UV-Absorption bei 260 nm, was sie auf die Anwesenheit eines gebundenen "Aktivators" in Form einer Pyrimidinbase oder eines Nukleotids schließen ließ. Eine Auftrennung dieses Gemisches an Sephadex G 75 hatte zu vier Hauptfraktionen geführt, die sich jedoch bei einer zweidimensionalen Chromatographie auf Dünnschichtplatten als komplizierte Gemische erwiesen. Eine Isolierung und weitere Charakterisierung einzelner Komponenten wurde nicht durchgeführt. Ebenso wurde nicht nachgewiesen, ob die vermuteten Nukleinsäurebausteine tatsächlich an Protein gebunden vorliegen.

Diese Ergebnisse waren von besonderer Bedeutung im Rahmen von Untersuchungen von SCHWEIGER und HANNIG (1969), denen es gelungen war, den Proteinanteil aus mRNA-Proteinkomplexen (30 s-Partikel aus dem Nukleosol) auf elektrophoretischem Wege

zu isolieren. Vergleichbare Partikel waren zuvor von SPIRIN und NEMER (1965) im Zytoplasma von Seeigeln nachgewiesen worden, die dafür die - inzwischen verbreitete - Bezeichnung "Informosomen" vorgeschlagen hatten. SPIRIN (1969) wie auch GIRARD und BALTIMORE (1966) konnten zeigen, daß derartige Proteine auch in freier Form im Zytoplasma vorkommen und in vitro mRNS binden können. Ihre Ergebnisse wurden durch die Befunde von SCHWEIGER und HANNIG (1971) bestätigt, denen es gelang, aus Rattenleber-Cytosol Proteinkomponenten zu isolieren, die in vitro RNS binden; ihr Verhalten in der analytischen Diskelektrophorese ergab sehr weitgehende Übereinstimmung mit dem Informosomenprotein aus 30 s-Partikeln. Die Mehrzahl der angeführten Autoren nimmt an, daß diese Komponenten eine Schutz- oder Trägerfunktion für die Nukleinsäuren ausüben.

Für derartige Eiweißkörper wurde jeweils ein Molekulargewicht von 40.000 - 45.000 angegeben, ein Ergebnis, das überraschenderweise auch auf ein Protein zutrifft, das in vitro bevorzugt DNA zu binden vermag (SCHWEIGER und SPITZAUER, 1972).

Parallel zu den beschriebenen Arbeiten wurde der Frage nachgegangen, ob sich im Nukleosol weitere Proteine oder Polypeptide (siehe HERP et al., 1970) nachweisen lassen, die fähig sind, in vivo Nukleinsäure oder deren Bausteine zu binden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl im Nukleosol wie im Cytosol zumindest eine Polypeptidkomponente vorkommt, die Adenin in fester Bindung enthält. Dieser Eiweißkörper wurde isoliert und in umfangreichen Versuchen hinsichtlich Homogenität, Molekulargewicht, Isoelektrischem Punkt, N-terminaler Aminosäure, Aminosäurezusammensetzung und der Bindungseigenschaften für Nukleinsäure(-vorstufen) charakterisiert. Dabei ergaben sich auffällige Parallelen zu den von SONNENBICHLER und NOBIS (1968) isolierten "residual proteins" bzw. zu den von KLEINSMITH und ALLFREY (1969) beschriebenen Phosphoproteinen, die jeweils noch geringe Mengen an fest gebundenen Nukleotiden enthalten.

Es konnte noch nicht geklärt werden, ob Adenin direkt oder

über Phosphatgruppen o.ä. an das Polypeptid gebunden ist.
Auf Grund der geringen Ausbeuten war auch eine quantitative
Bestimmung des Adeningehalts nicht möglich.

AUFGABENSTELLUNG

An einem geeigneten Objekt soll untersucht werden, ob in der Fraktion der niedermolekularen löslichen Kernproteine Komponenten vorkommen, die fähig sind, Nukleinsäuren bzw. deren Vorstufen zu binden.

Derartige Komponenten sollen möglichst in präparativem Maßstab isoliert und charakterisiert werden.

Weitere Untersuchungen sollen darüber Aufschluß geben, ob derartige Substanzen auf bestimmte Zellkompartimente beschränkt sind und damit Rückschlüsse auf etwaige Transportvorgänge in der Zelle zulassen.

Ein besonderer Schwerpunkt soll auf die Anwendung moderner elektrophoretischer Verfahren gelegt werden.

ERGEBNISSE

I. Auswahl und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials (Yoshida-Ascites-Zellen)

Zur Wahl eines geeigneten Untersuchungsobjekts wurden folgende Überlegungen angestellt:

Das Zellmaterial soll - für präparative Arbeitsweise mit dem nur in geringer Konzentration vorliegenden Polypeptidanteil (wie schon aus Versuchen von HERP et al. hervorgeht) - in ausreichender Menge möglichst jederzeit verfügbar sein.

Es soll möglichst einheitlich sein, um das Problem einer Zuordnung isolierter Proteine zu unterschiedlichen Zelltypen zu vermeiden, sowie um deren Lokalisierung in verschiedenen Zellkompartimenten grundsätzlich zu ermöglichen.

Ferner muß ein rasch proliferierendes bzw. stoffwechselintensives Gewebe gewählt werden, um unter Verwendung radioaktiver Substanzen die Bindung von Nukleinsäuren oder deren Vorstufen an Protein in vivo eindeutig erfassen zu können.

Ein Teil dieser Voraussetzungen wäre z.B. bei Arbeiten mit Rattenleberzellen erfüllt; beträchtlichen Aufwand würde allerdings die Gewinnung von stark proliferierendem Material mit sich bringen. Zu diesem Zweck wären partiell hepatektomierte Ratten oder eine große Anzahl von Rattenembryonen erforderlich. Diese Schwierigkeiten treten nicht auf bei einem einheitlichen "flüssigen Gewebe", das sich zudem auch noch äußerst schnell vermehrt, wie dem Yoshida-Ascites. Dabei handelt es sich um einzeln vorliegende Krebszellen, die sich suspendiert in einer Gewebsflüssigkeit in der Bauchhöhle von Ratten vermehren. Aus einer Ratte lassen sich durchschnittlich 30-50 ml Ascitesflüssigkeit gewinnen, die wiederum ca. 20 Vol-% zelluläre Bestandteile enthält.

Eigene Versuche haben gezeigt, daß dieses Material nur in 10-15 % der Fälle in nennenswertem Ausmaß durch Erythrozyten

verunreinigt ist. Derartige Zellsuspensionen wurden nur verwendet, soweit der Anteil der Erythrozyten weniger als 3 % betrug (bezogen auf die Anzahl der Zellen); eine weitergehende Reinigung kann bisher nur auf dem Weg einer komplizierten Differentialzentrifugation oder - in kleinen Mengen - auf elektrophoretischem Wege (KRÜSMANN und HANNIG, 1968) erreicht werden. Es wurde daher auf diese Verfahren verzichtet.

Eine Suspension von Ascites-Zellen, wie sie aus der Bauchhöhle einer Ratte entnommen wird, enthält neben zerfallendem Zellmaterial in gelöster Form viele verschiedenartige Stoffe, wie Salze, Zucker usw., vor allem aber Proteine, die u.U. in den Krebszellen selbst gar nicht enthalten sind. Diese würden bei den Untersuchungen möglicherweise zu Fehlschlüssen verleiten. Zu ihrer Entfernung wurden die Zellen mehrfach mit eiskalter 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Erfahrungsgemäß werden unter diesen Bedingungen auch solche Proteine abgelöst, die an der Zelloberfläche adsorbiert vorliegen (neuere Literatur bei KRÜSMANN und HANNIG, 1968).

II. Versuche zur Isolierung von Polypeptiden mit Bindungsaktivität für Nukleinsäuren oder deren Vorstufen aus Yoshida-Ascites-Zellen

1) Waschen und Homogenisieren der Zellen

Unmittelbar vor dem Homogenisieren wurde das Zellmaterial mit ungepufferter, hypotonischer Saccharoselösung 1 x gewaschen. Durch dieses Medium sollte die vorher angewandte NaCl-Lösung möglichst vollständig gegen den zukünftigen Homogenisations-"Puffer" ausgetauscht werden, da in einer Salzlösung freiwerdende globuläre Proteine wesentlich besser löslich sind als in einer salzfreien, und auf diese Weise schon vorzeitig aus Zellorganellen extrahiert werden. Ein weiterer, beabsichtigter Effekt lag darin, die Zellen durch das hypotonische Medium zum Quellen zu bringen, um das spätere Aufbrechen der Zellmembran zu erleichtern. Eine derartige Vorbehandlung wurde

von PENMAN (1966) für die ebenfalls sehr stabilen HeLa-Zellen angegeben.

Zur Stabilisierung der freiwerdenden Membranen enthielt das hypotonische Medium 0,001 M Magnesiumchlorid.

Die "gewaschenen" Zellen wurden daraufhin mit einem Homogenisator nach EMANUEL und CHAIKOFF (1957) aufgeschlossen, dessen wirksamer Teil, eine Ringdüse, stufenweise (17 μ m, 28 μ m, 35 μ m, 64 μ m) verändert werden kann. Zur Isolierung der Kerne erwies sich eine Spaltabmessung von 17 μ m als günstig. Nach zweimaliger Passage unter diesen Bedingungen konnten bei Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop nur noch etwa 5 % ganze Zellen neben 95 % Kernen aufgefunden werden.

Ein Aufschluß der Zellen im meist verwendeten Potter-Elvehjem-Homogenisator (POTTER und ELVEHJEM, 1936) erwies sich dagegen als sehr unvorteilhaft: Der größte Teil der Asciteszellen wird nicht aufgebrochen, auch nicht unter den "harten" Bedingungen eines engen Spalts (5 Passagen); der Rest besteht aus Kernen, an denen große zytoplasmatische Bereiche haften.

2) Isolierung der Zellkerne und Extraktion von Kernsaftproteinen (Nucleosol)

Eine Reinigung der Asciteskerne nach der Standardmethode von CHAUVEAU et al., (1956) für Leberkerne erwies sich als nicht anwendbar: Bei einer Zentrifugation des Homogenats durch die dichtere Saccharoseschicht (2,2 - 2,4 M), die entweder homogen oder als Gradient vorliegt, werden Kerne und cytoplasmatische Anteile nicht getrennt.

Aus dem Homogenat konnten jedoch ganze Zellen durch kurzes Abschleudern in einer Zentrifuge bei 700 g als Pellet entfernt werden: ganze Zellen sind in diesem Falle spezifisch schwerer als Zellkerne (s. Aufarbeitungsschema S. 65).

Anschließend wurden die Kerne vier- bis fünfmal in isotonischer Saccharoselösung (mit 1 mM $MgCl_2$) gewaschen, bis der Überstand

klar blieb. Zum Resuspendieren des Kernpellets wurde dabei ein Potter-Elvehjem-Homogenisator (weiter Spalt) benutzt. Auf diese Weise wurden aus 40 ml Ascitesflüssigkeit etwa 10 g Asciteszellen erhalten, die wiederum ca. 2 g Kerne (Feuchtgewicht) ergaben: das Kernvolumen ist bei diesem Untersuchungsobjekt außerordentlich groß im Verhältnis zum Zellvolumen. Vollkommen glatte Kernoberfläche, wie sie bei Leberkernen bekannt ist, konnte bei Ascites-Kernen nicht erreicht werden. Wie die Fotografien zeigen, sind jedoch weder im Phasenkontrast- noch im Elektronenmikroskop auffällige Zytoplasma-Anteile zu sehen (s. Abb. 1).

Zunächst wurde mit Extrakten aus Zellkernen gearbeitet.

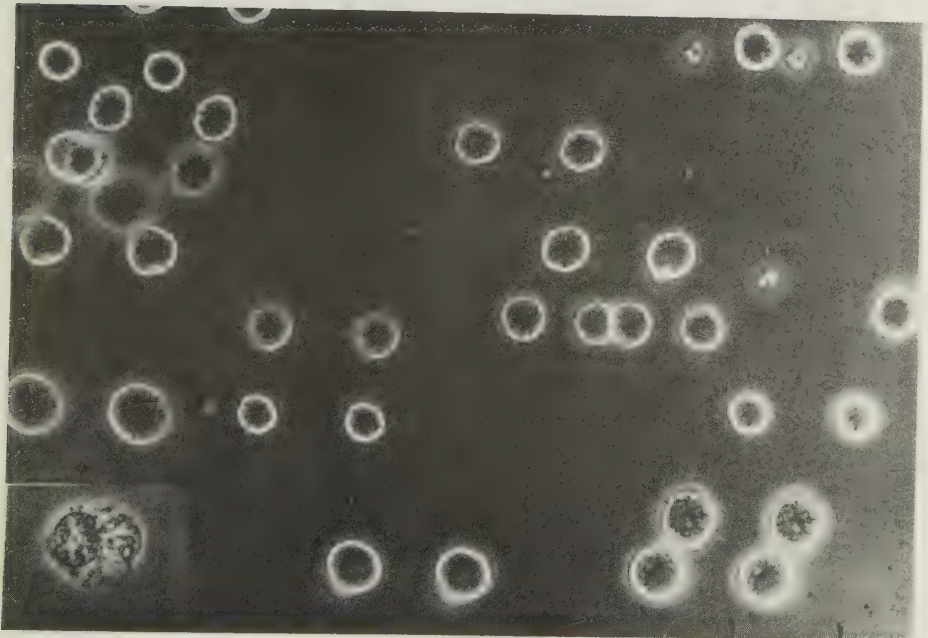


Abb. 1a

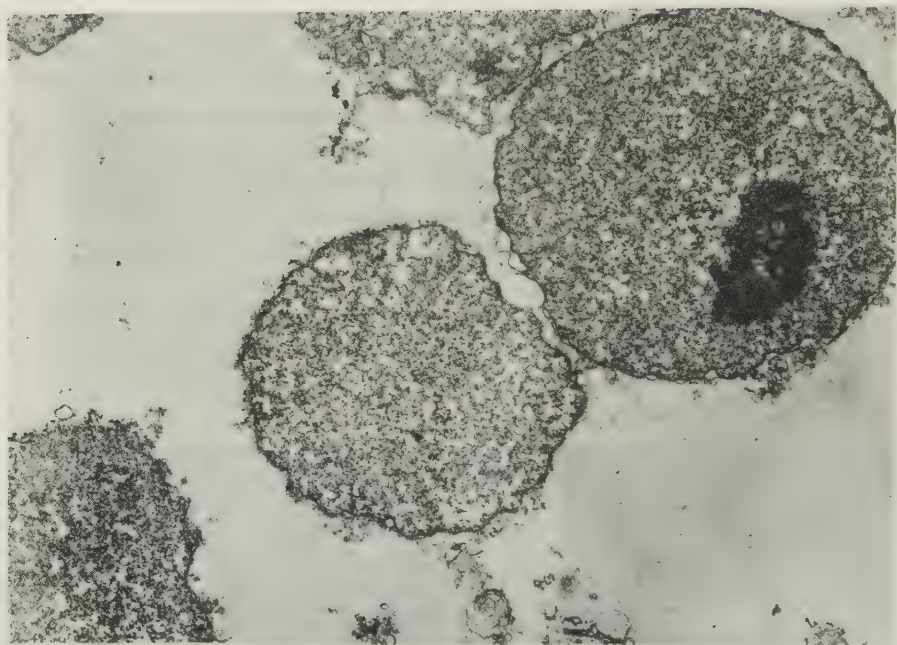


Abb. 1b

- Abb. 1 a) Isolierte Kerne aus Yoshida-Asciteszellen im
Phasenkontrastmikroskop (Endvergrößerung 820 x;
Zeiss Photomikroskop II). Deutlich erkennbar ist
die - gegenüber Rattenleberkernen - "rauhe" Ober-
fläche der Organellen (links unten Ascites-Zellen)
- b) Ascites-Kerne im Elektronenmikroskop (Einbettung
in Epon; Ultradünnschnitt; Endvergrößerung
37.500 fach; JEM T7 der Firma Jeol)

Das Ascites-Kernmaterial wurde anschließend mit gepufferter Kochsalzlösung (0,14 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris) extrahiert, wie es PATEL und WANG (1964) zur Gewinnung löslicher Kernproteine vorschreiben. Dabei zeigte es sich, daß die Protein-

ausbeute bei pH 8,5 um etwa 30 % höher liegt als bei pH 7,2, ohne daß sich im Proteinmuster (einer entsprechenden Disk-elektrophorese in Polyacrylamid-Gel) wesentliche Unterschiede feststellen lassen.

3) Polyacrylamid-Gel-Diskelektrophorese von Kernsaftproteinen

Die Diskelektrophorese ist ein modernes Standardverfahren zur Trennung von Makromolekülen, das von ORNSTEIN (1964) beschrieben wurde.

Zur Auftrennung von Proteingemischen z.B. wird in Glasröhrchen eine Lösung des Monomers Acrylamid mit dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid zu einem durchsichtigen Polyacrylamidgel polymerisiert; als Katalysatorsysteme fungieren dabei entweder Ammoniumperoxidisulfat/Tetramethyläthylendiamin oder Riboflavin/UV-Licht. Die ausgezeichnete Trennwirkung derartiger Gele beruht auf einem Zusammenwirken mehrerer Faktoren: 1) Dem Molekularsiebeffekt, d.h. einer Trennung nach Molekülgröße, 2) einer Trennung nach der elektrophoretischen Beweglichkeit der Moleküle (verursacht durch ihre Größe und Nettoladung), wobei das Gel eine Herabsetzung der Diffusion bewirkt, und 3) der Konzentrierung des zu trennenden Gemisches vor dem Eindringen in das Gel durch ein diskontinuierliches Puffersystem, die mit einem Sammelgel, einer Auftragslösung mit verminderter Leitfähigkeit, oder (und) einem pH-Sprung erreicht werden kann (HJERTEN, JERSTEDT, TISELIUS, 1965).

Im vorliegenden Fall ließen sich die extrahierten Kernsaft-Proteine in analytischem Maßstab gut auftrennen, und zwar in einem Diskelektrophorese-System bei pH 4,5, wie es GEESTELAND und STAEHELIN (1967) für Ribosomenprotein angegeben haben. Vor allem der Zusatz von 8 M Harnstoff trug wesentlich zur Ausbildung von klar getrennten Proteinzonen bei.

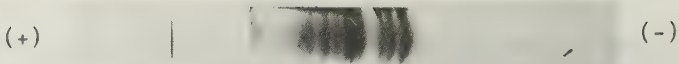


Abb. 2 Diskelektrophoretische Auftrennung der löslichen
"Kernsaft"-Proteine aus Ascites (10 % PAA-Gel;
pH 4,5)

Nach einer Diskelektrophoresetrennung unter den angegebenen Bedingungen (s.o., bzw. MATERIAL UND METHODEN: Punkt 6) waren mindestens 12 klar voneinander getrennte Proteinbanden im Gelstäbchen zu erkennen. Besonderes Augenmerk richtete sich bei dieser Verteilung auf eine Gruppe von mindestens vier vorauslaufenden Proteinbanden: bei ihnen sollte es sich entweder

- a) um stark positiv geladene (eventuell also basische) Proteine handeln, wie ein Vergleich mit dem Verhalten von Histonen oder ribosomaler Proteine unter entsprechenden Elektrophoresebedingungen gezeigt hat, oder (und)
- b) um sehr kleine Eiweißkörper, denen der netzartige Aufbau der PAA-Gelmatrix wenig Widerstand zu leisten vermag (u.a. MAURER, 1968).

Bei der unter b) geäußerten Annahme könnten die gesuchten Peptide mit diesen Banden identisch sein.

4) Vergleich von Nucleosol-Proteinen mit einer "Peptid"-Fraktion des Cytosols in der Diskelektrophorese

Bei diesem Stand der Untersuchungen zeichnete sich schon eines der wesentlichen Probleme der vorliegenden Arbeit ab: die relativ geringe Menge an Kernsaftprotein (ca. 20 mg/5 Ratten), das für die folgenden Reinigungs- und Charakterisierungsschritte zur Verfügung stand. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, wurden auch andere Fraktionen des Ascites-Homogenats untersucht mit dem Ziel, größere Mengen der bei der Diskelektrophorese von Kernsaft stark wandernden "Peptid"-Komponenten zu erhalten.

Hierzu wurde aus der Zytoplasma-Fraktion ein partikelfreier Überstand (Cytosol) präpariert, wie im Kapitel MATERIAL UND METHODEN beschrieben. Zur Anreicherung des Polypeptidanteils aus dem Cytosol bot sich das "klassische" Verfahren der fraktionierten Fällung mit Aceton als sinnvoll an: Bei höherer Acetonkonzentration bleiben bevorzugt kleinere Moleküle noch in Lösung. Die Methode wurde einer fraktionierten Fällung mit Ammonsulfat vorgezogen, da Aceton durch einfaches Trocknen der ausgefällten Polypeptide entfernt werden kann, Ammonsulfat-Reste hingegen durch zeitraubende Dialysen, die gleichzeitig zu großem Materialverlust führen, da herkömmliche Dialyseschläuche für Molekulargewicht von 10.000 bis 20.000 noch durchlässig sind (Herstellerangaben der Fa. Kalle).

Es zeigte sich, daß bei einer Konzentration von 63-78 % Aceton bei 0-5° C aus dem Cytosol eine Proteinfraction ausfiel, die neben Aminosäuren einen wesentlichen Anteil an Polypeptiden enthielt (ca. 40 mg/5 Ratten). Sie erwies sich zu 90-95 % in verdünntem Formiatpuffer vom pH 4,5 löslich. Eine Durchführung der Acetonfällung bei -10 bis -15° C zeigte keinen Einfluß auf Zusammensetzung oder Löslichkeitsverhalten dieses Proteingemisches.

Ein Vergleich der auf diese Weise erzielten Fraktion mit den isolierten Nukleosol-Proteinen wurde mit der "split-gel"-Technik durchgeführt, die TRAUT, MOORE et al. (1967) beschrieben haben.

Bei dieser Technik handelt es sich um eine Modifikation des PAA-Diskelektrophoreseverfahrens. In das Sammelgel wird eine Trennwand einpolymerisiert, die dicht an den Glaswänden des Glasröhrchens anliegt und auf diese Weise über dem Sammelgel zwei getrennte Kammern bildet. Diese können mit unterschiedlichen Protein- oder RNS-Proben beschickt werden, die während einer Elektrophorese im gleichen Gel unter identischen Bedingungen aufgetrennt werden, ohne sich zu vermischen, ein Umstand, der mit zwei sich entsprechenden Glasröhrchen nur annähernd erreicht

werden kann. Eine derartige Versuchsanordnung ermöglicht demnach eine exakte Zuordnung zweier Komponenten bezüglich ihrer elektrophoretischen Eigenschaften.



Abb. 3 "split-gel"-Diskelektrophorese: In der oberen Hälfte des Diskstäbchens wurden Kernsaftproteine aus Yoshida-Ascites, in der unteren Eiweißkörper der Cytosolfraktion (s. S. 15) aufgetragen. Im Sammelgel ist noch der Spalt zu sehen, aus dem die einpolymerisierte Trennwand entfernt wurde (10 % PAA-Gel; pH 4,5).

Abbildung 3 gibt eine gleichzeitige Auftrennung der Nukleosol- (obere Hälfte) und der Cytosol-"Polypeptidfraktion" (untere Hälfte) im "split-gel" wieder. Eine Reihe von Proteinbanden aus beiden Proben sind gleich weit in Richtung Kathode gewandert, insbesondere die - bisher schon als mögliche Polypeptide betrachtete - Gruppe der vier am weitesten gelaufenen Zonen (im Original besser zu beurteilen als an der fotografischen Aufnahme).

Auf Grund dieses Befundes erschien es gerechtfertigt, als Ausgangsmaterial für die weitere Isolierung der gesuchten Peptide den partikelfreien Überstand des Gesamthomogenats von Asciteszellen zu verwenden.

5) Auftrennung der "Polypeptid"-Fraktion aus dem Gesamthomogenat mit der trägerfreien Elektrophorese

Die Proteinfraction, die zwischen 63- und 78 % Acetonkonzentration ausfällt, enthält zusätzlich noch beträchtliche Mengen an Nukleotiden, Aminosäuren und anderen Verbindungen. Es war daher nicht zu erwarten, daß ein säulenchromatographisches Verfahren - auf der Basis von Ionenaustauschern oder Molekül-

sieb-Gelen, wie Sephadex oder Bio-Gel - eine weitgehende Auftrennung des heterogenen Gemisches erbringen würde.

Nach den Arbeiten von SARKAR (1966) und SCHWEIGER (1967), erschien es vorteilhaft, das Verfahren der trägerfreien Ablenkungselektrophorese (VAP) nach HANNIG (1964) anzuwenden, mit dem es im ersteren Fall gelungen war, Virusprotein und -nukleinsäure voneinander zu trennen, im letzteren, Ribosomen von Proteinverunreinigungen zu befreien.

Bei dem Verfahren der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese (VAP) wird das aufzutrennende Material in einen zwischen zwei Glasplatten frei strömenden Pufferfilm eingespritzt. An diesem Film liegt eine hohe Gleichspannung an, in deren elektrischem Feld Moleküle bei ihrer Wanderung mit dem Pufferfilm entsprechend ihrer Ladung mehr oder weniger stark abgelenkt werden.

Die Auftrennung der "Peptid"-Fraktion aus dem Homogenat wurde mit - oder ohne - Zusatz von 4 M Harnstoff durchgeführt. Ebenso wurden die pH-Bereiche variiert. Dabei zeigte sich das Trennverfahren als besonders leistungsfähig bei pH 4,5 und bei pH 8,5. Die Verwendung von Harnstoff ergab im Bereich der proteinhaltigen Fraktionen 52-67 eine noch etwas bessere Auftrennung (s. Abb. 15 bzw. Abb. 17). Dieser Vorteil ließ sich im Hinblick auf eine weitere Charakterisierung der Polypeptide jedoch nicht nutzen, da die gesuchten Eiweißkörper anschließend weder durch 10 %ige TCA noch durch 10 %ige PCA ausgefällt und so von dem - bei späteren Untersuchungen störenden - Harnstoff getrennt werden konnten.

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis eines derartigen Versuchs bei pH 4,5: Es sind verschiedene, deutlich voneinander getrennte Fraktionsbereiche zu erkennen. Um zu erfahren, welche Stoffe sie vornehmlich enthalten, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen jeweils Test-Aminosäuren, Nukleotide, oder Nukleoproteide in die Elektrophoresekammer eingespritzt wurden. Dabei zeigte sich, daß Nukleotide auf Grund ihrer höheren negativen Überschußladung - verursacht durch ihre Phosphatgruppen - besonders stark in Richtung auf die positive Elektrode abgelenkt

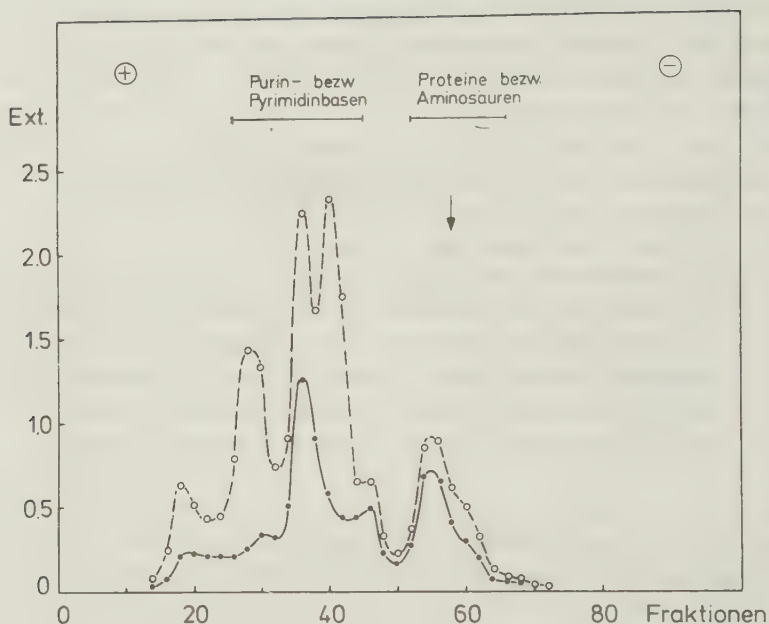


Abb. 4 Auftrennung der Acetonfällungs-Fraktion (63-78 % Aceton-
konzentration) in der kontinuierlichen trägerfreien
Elektrophorese nach HANNIG (↓ = an dieser Stelle der
Trennkammer wird die Probe eingespritzt; •—• = Ext.
bei 280 nm; o—o = Ext. bei 260 nm; pH 4,5

werden (Fraktion 25-35), Aminosäuren hingegen zum größten Teil vom elektrischen Feld unbeeinflusst bleiben und mehr oder weniger direkt unter der Einspritzstelle die Trennkammer verlassen; viele von ihnen finden offensichtlich bei einer derartigen Trennung pH-Milieubedingungen vor, die nicht weit von ihrem isoelektrischen Punkt entfernt sind. Ribosomen und andere Nukleoproteinkomplexe nehmen eine Mittelstellung zwischen den bereits genannten Verbindungen ein.

Hieraus und aus Kontrollexperimenten mit fraktionierter Acetonfällung ergaben sich Anhaltspunkte, daß die polypeptidhaltigen

VAP-Fractionen 53-63 auch noch freie Aminosäuren (und Acetonreste, die hohe Extinktion bei 260 nm verursachen) enthalten, wie sie in der Zelle in freier Form für Syntheseleistungen bereitgehalten werden.

Bei pH 4,5 wie auch bei pH 8,5 war keine weitere Auftrennung oder eine Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Polypeptide festzustellen (s. auch Abb. 15). Daraus war zu folgern, daß die isoelektrischen Punkte dieser Eiweißkörper nahe beieinander und im Neutralbereich liegen. Daß die Polypeptide in beiden pH-Bereichen in den gleichen Fraktionen erscheinen, dürfte an den elektroosmotischen Erscheinungen in der Trennkammer liegen.



Abb. 5 Diskelektrophorese der Fraktionen 55-57 aus der
trägerfreien Elektrophorese (pH 4,5; 10 % PAA-Gel).
Im Vergleich zu Abb. 2 sind Proteine mit höherem
Molekulargewicht deutlich vermindert.

Bei einer Auftrennung der VAP-Fractionen 55-57 im analytischen Diskelektrophoreseverfahren (pH 4,5) zeigte sich (Abb. 5):

- a) daß die Polypeptide P_1 und P_2 sich nach der Abtrennung eines Großteils der Verunreinigungen wesentlich besser voneinander trennen lassen als vorher,
- b) daß die trägerfreie Elektrophorese geeignet ist, einen Großteil höhermolekularer Eiweißkörper (Fraktionen 59-68) abzutrennen.

Aus Abbildung 5 geht hervor, daß der weniger weit kathodisch laufende Proteinanteil deutlich vermindert ist.

6) Isolierung von Polypeptiden durch Gelfiltration

Nach einer VAP-Trennung waren die zu untersuchenden Polypeptide noch mit einem beträchtlichen Anteil an Aminosäuren sowie mit geringen Mengen von Proteinen höheren Molekulargewichts verunreinigt. Zur Entfernung dieser unerwünschten Begleitstoffe mußte ein geeigneter weiterer Trennschritt gefunden werden. Zwei Möglichkeiten boten sich an: eine Trennung nach der Nettoladung ($= \zeta$ -Potential), die gelöste Moleküle nach außen hin aufweisen, oder nach dem Molekulargewicht.

Eine Chromatographie an Ionenaustauschern oder eine Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt im Ampholytgradienten (s. S. 28), die beide dem ersteren Verfahren zuzurechnen sind, erwiesen sich schon auf Grund theoretischer Überlegungen als wenig günstig: VAP-Trennungen hatten gezeigt, daß die auf nur wenige Fraktionen aufgetrennten Proteine nur geringe Ladungsunterschiede zeigen.

Versuche mit der isoelektrischen Fokussierungstechnik ergaben, daß sich Ampholyte der Firma LKB (Bromma, Schweden) an die angereicherten Ascites-Polypeptide komplexartig binden. Derartige Komplexe sollten sich nach Angaben von NILSSON, WADSTRÖM and VESTERBERG (1970) durch extensive Dialyse oder durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung zerlegen lassen.

Mit beiden Verfahren waren im vorliegenden Fall große Substanzverluste und - im letzteren Falle - unvollständige Abtrennung der Ampholyte verbunden, wie anschließende Aminosäureanalysen (s.u. MATERIAL UND METHODEN: 10)) gezeigt haben: die Hydrolyseprodukte der Polyaminopolycarbonsäure-Ampholyte störten den Elutionsgradienten des verwendeten Aminosäure-Autoanalyzers derart, daß einwandfreie Trennungen unmöglich werden und quantitative Aussagen nicht erhalten werden können.

Eine Trennung nach unterschiedlichem Molekulargewicht (Gelfiltrationsmethode nach PORATH und FLODIN, 1959) kam der

Problemstellung entgegen, die Polypeptidfraktion in ihren molekularen Eigenschaften zu charakterisieren.

Für die Methode der Gelfiltration steht Trennmateriale auf Dextran- oder Polyacrylamidbasis in Form von kleinporigen Kügelchen mit definierten Eigenschaften zur Verfügung. Prinzip der Methode: Je nach Molekülgröße kann eine Substanz mehr oder weniger weit in die gequollenen Gelkörner eindringen: Moleküle, die größer als die Poren des Gels sind, werden ausgeschlossen und durchwandern das Gel am schnellsten, kleinere Moleküle dringen in die Gelkörner ein und werden auf ihrer Wanderung stärker verzögert.

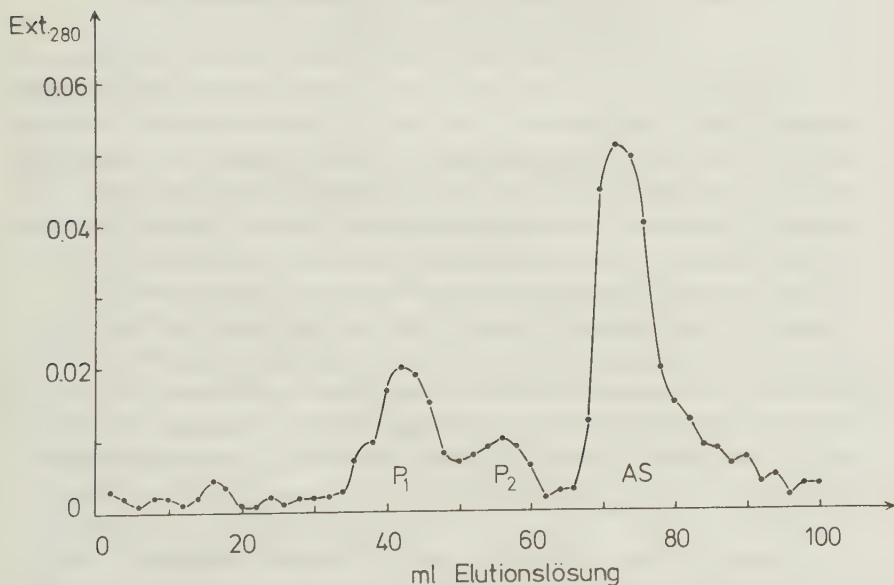


Abb. 6 Auftrennung der VAP-Fractionen 54-59 an Bio-Gel P10
 (—●— Ext. bei 280 nm); (P₁ und P₂: Polypeptidfraktionen; AS = Aminosäuren)

Zur Auftrennung der Proteinfractionen 54-59 aus der trägerfreien Elektrophorese (s. Abb. 4) wurde ein Polyacryl-Gel mit relativ kleinem Porendurchmesser gewählt: Bio-Gel P10 (Bio-Rad, Grärfelfing). Dieses Produkt ist für Substanzen mit einem MG von 5.000-17.000 geeignet.

Eine derartige Trennung ergab drei klar voneinander getrennte Peaks, wie Abbildung 6 zeigt. Entsprechende Fraktionen erwiesen sich als farblos und wasserklar.

Nach diesem Präparationsverfahren ließen sich aus dem Nukleosol etwa 40 γ, aus dem Cytosol ca. 60-90 γ, und aus dem Gesamthomogenat 110-180 γ an P₁ isolieren; die Ausbeute an P₂ betrug jeweils etwa die Hälfte.

III. Charakterisierung der Polypeptide

1) Prüfung der Homogenität durch Diskelektrophorese

Die Peaks "P₁", "P₂" und "AS" wurden anschließend in der analytischen Diskelektrophorese bei pH 4,5 auf ihre Zusammensetzung geprüft. Dabei ergab sich, daß in "P₁" (später häufig synonym mit dem Polypeptid gebraucht) eine stark kathodisch wandernde Proteinbande und einige in der Fotografie (Abb. 7b oben) ganz schwach erkennbare Proteine vorliegen, in "P₂" ebenfalls eine deutlich erkennbare Proteinzone, die noch etwas weiter kathodisch wandert. Die split-gel-Technik bestätigte diese Zuordnung: P₂ entspricht demnach der am weitesten vorauslaufenden Bande des Kernextraktes aus Asciteskernen, P₁ der darauf folgenden. "AS" dagegen enthält kein hochmolekulares Protein (in der analytischen Diskelektrophorese zeigte sich keine anfärbbare Proteinzone!) und dürfte zumindest z.T. aus Aminosäuren bestehen, da es sich um Ninhydrin-positives Material handelt.

Eine quantitative Auswertung der vom Chromoscan-Gerät registrierten Auftrennungen von P₂ und P₁ (s. Abb. 7a) ergab für die Polypeptidkomponente P₂ eine Reinheit von 65-80 % (Verunreinigung durch P₁), für P₁ eine Reinheit von 85-90 % (sehr geringe Verunreinigung durch P₂ und höhermolekulare Proteine).



Abb. 7a



Abb. 7b

- Abb. 7 a) Auftrennung der Bio-Gel-Säulenfraktion P_1 in der Diskelektrophorese (registriert vom Joyce-Loebl-Chromoscan). Auf der anodischen Seite des P_1 -Peaks sind noch geringe Verunreinigungen zu erkennen, die auf höhermolekulare Proteine zurückzuführen sind.
- b) Auftrennung der Bio-Gel-Säulenfraktionen P_1 (oben) und P_2 (unten) (Fotografie der Diskelektrophoresestäbchen). Zu Demonstrationszwecken wurde im letzten Falle eine Säulenfraktion ausgewählt, die noch mit relativ großen Mengen an P_1 verunreinigt ist.

2) Aufnahme des UV-Spektrums

Ein UV-Spektrum der Polypeptidkomponente P_1 ergab einen deutlichen Hinweis auf Begleitsubstanzen in Form von gebundenen Nukleotiden oder Purin- bzw. Pyrimidinbasen (s. Abb. 8). Das Verhältnis der Extinktionen $\text{Ext.}_{260\text{nm}}/\text{Ext.}_{280\text{nm}}$ lag bei dem Wert

1,25: bei typischen Proteinen würde es jedoch zwischen 0,45 und 0,67 liegen, bei Nukleinsäuren zwischen 2,1 und 2,5. Ribosomen als Nukleinsäure-Protein-Komplexe weisen ein Verhältnis $\text{Ext.}_{260}/\text{Ext.}_{280}$ von 1,7 bis 1,8 auf. Legt man die Angaben von LAYNE (1957) zur Berechnung des Nukleinsäureanteils von Proteinen aus dem Verhältnis $\text{Ext.}_{260}/\text{Ext.}_{280}$ zugrunde, so ergibt sich aus dem Wert 1,25 ein Nukleinsäureanteil von 6,5 %.

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf das Polypeptid P_1 , da P_2 nicht in vergleichbarer Reinheit vorlag und - soweit unter diesen Umständen erkennbar - keine auffälligen spektralen Eigenschaften zeigte (s. auch S. 22).

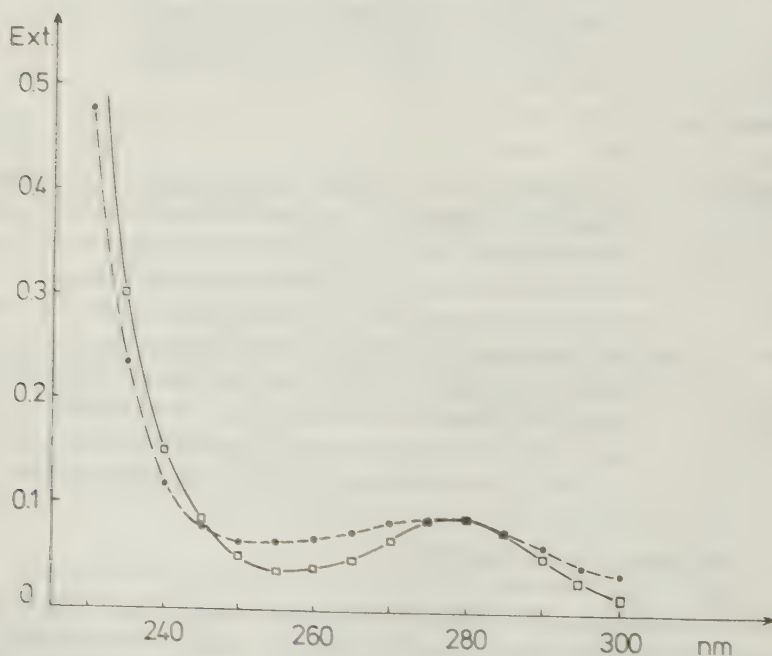


Abb. 8 UV-Spektrum des Polypeptids P_1 (in Wasser gelöst).
 ($\square$ — $\square$ -Spektrum von Rindersealbumin; $\bullet$ — $\bullet$ -Spektrum von P_1)

3) Bestimmung des Molekulargewichts mit der Natrium-dodecylsulfat-Methode

Es erschien interessant, nach der analytischen Diskelektrophorese noch weitere Kriterien für die Homogenität der Bio-Gel-Säulenfraktion P_1 heranzuziehen. Dazu konnten jedoch aus Materialgründen nur solche ausgewählt werden, deren Prüfung mit relativ geringem Substanzaufwand verbunden ist. In Betracht kamen in jüngster Zeit entwickelte Mikromethoden wie eine Bestimmung der N-terminalen Aminosäure, des Molekulargewichts nach der SDS-Methode im PAA-Gel, und des isoelektrischen Punkts. In den letzten Jahren hatte sich gezeigt, daß vor allem die beiden letzteren Methoden imstande sind, entweder kleinste Unterschiede im Molekulargewicht (DUNKER und RUECKERT, 1969; GLOSSMANN und LUTZ, 1970) oder in der Aminosäurezusammensetzung einer Substanz (BOURS u. DOORENMAALEN, 1970) zur analytischen Trennung und Identifizierung zu nutzen: HAYES und WELLNER (1969) z.B. war es gelungen, durch isoelektrische Fokussierung eine Reihe von Isoenzymen der bisher als einheitlich angesehenen L-Aminosäure-Oxidase (*Crotalus adamanteus*) nachzuweisen.

Aus naheliegenden Gründen erschien im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung des Molekulargewichts der isolierten Substanzen vordringlich.

SHAPIRO, VINUELA und MAIZEL haben im Jahre 1967 eine Methode beschrieben, nach der Molekulargewichte von Proteinen - mit einem Bruchteil des Materialaufwandes für die entsprechende Ultrazentrifugenmethode (YPHANTIS, 1960) mit ebenso großer Genauigkeit im PAA-Gel in Gegenwart des Detergens Natriumdodecylsulfat bestimmt werden können. Dazu ist es notwendig, vor dem eigentlichen "Diskelektrophorese-Verfahren" die Eiweißkörper zu reduzieren und mit diesem Detergens in "random-coiled proteins" zu denaturieren.

Die Wanderungsgeschwindigkeit derart vorbehandelter Proteine, die durch die Kraft eines elektrischen Feldes

im PAA-Gel vorwärts getrieben werden, ist dann unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung, und nur proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts (ähnlich dem Prinzip der Gelfiltration). Im Vergleich mit Testsubstanzen, deren Molekulargewicht bekannt ist, kann das MG der unbekannten Probe ermittelt werden.

Seither hat diese Methode in viele biochemische Laboratorien Eingang gefunden und ist dabei immer mehr speziellen Anwendungsgebieten angepaßt worden.

Zur Auftrennung von Polypeptiden wurden auf Grund der negativen Erfahrungen von WEBER und OSBORN (1969) mit üblichen PAA-Gelen von 10-15 % Monomer-Konzentration eine Verbesserung versucht, in dem einmal ein Sammelgel zur Schärfung der einwandernden Proteinfront verwendet wurde (mit eingebautem pH-Sprung), zum zweiten aber 6 M Harnstoff in alle Gele einpolymerisiert wurde, der schon bei anderen Diskelektrophoreseverfahren (s. S. 13) zu schärferen Trennungen beigetragen hatte.

Während dieser Versuche haben SWANK und MUNKRES (1971) ein Verfahren, speziell für "Oligopeptides" angegeben, das ohne Sammelgel, aber mit 8 M Harnstoff im Trenngel arbeitet.

Beide Verfahren wurden mit dem gewünschten Erfolg angewendet: Polypeptide wiesen schärfere Banden gegenüber früheren Methoden auf und wurden gut getrennt (s. Abb. 9a und b).

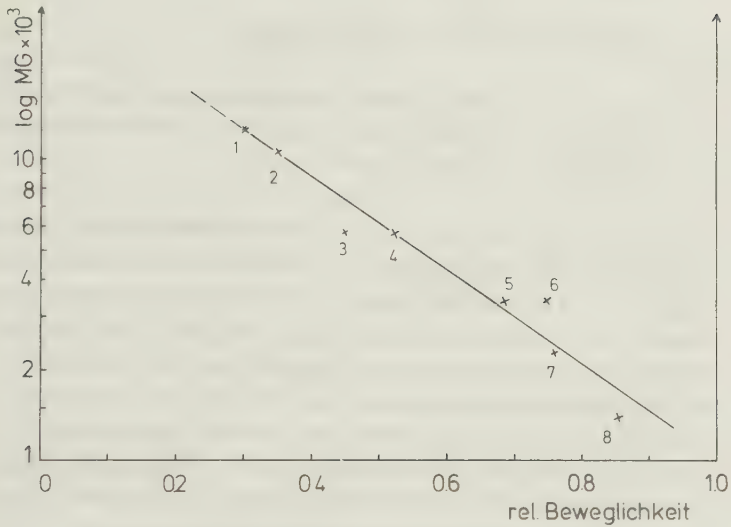


Abb. 9a

(+)

(-)

Abb. 9b



1 = Cytochrom C

2 = P₁-Ascites bzw. P₁'-Leber

3 = Insulin

4 = P₂-Ascites

5 = Insulin-B-Kette

6 = Glucagon synth.

7 = Insulin-A-Kette

8 = Bacitracin

Abb. 9c

Abb. 9 a) Auftrennung der Fraktionen 55-57 aus der trägerfreien Elektrophorese im SDS-Diskelektrophoreseverfahren

(System von SWANK und MUNKRES; 12,5 % PAA-Gel; 8 M Harnstoff; pH 6,8)

b) SDS-Diskelektrophorese der Bio-Gel-Säulenfraktion P₁ (eigenes System mit oberem Gel; 12,5 % PAA; 6 M Harnstoff; pH 7,0)

c) Ermittlung des Molekulargewichts der Peptide P₁ (10.500) und P₂ (5.600) mit einer Eichkurve (hergestellt unter den Bedingungen von a))

Auf Grund der vorgelegten Ergebnisse (Abb. 9) ist demnach für P_2 ein Molekulargewicht von 5.600 ($\pm 8\%$), für P_1 von 10.500 ($\pm 5\%$) anzusetzen. Beide Substanzen erwiesen sich unter diesen Trennbedingungen als einheitlich (in den auf S. 22 angegebenen Grenzen).

4) Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Als ein weiteres Kriterium für die Homogenität der isolierten Polypeptidfraktion P_1 wurde das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung herangezogen.

Dabei handelt es sich um ein von VESTERBERG und SVENSSON im Jahre 1966 entwickeltes Verfahren, das unterschiedliche isoelektrische Punkte der Proteinkomponenten eines Gemisches zu dessen Auftrennung benützt. Zur Herstellung eines pH-Gradienten finden Ampholyte (Polyaminopolycarbonsäuren, hergestellt von der Fa. LKB, Bromma, Schweden) Verwendung, die sich in der Kettenlänge des Kohlenstoffskeletts sowie in Art und Anzahl der Substituenten ($-\text{SO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, usw.) unterscheiden. Dadurch liegt eine Vielzahl grundsätzlich ähnlich gebauter Moleküle vor, die in einem elektrischen Feld in wässriger Lösung solange wandern, bis sie eine Stelle eingenommen haben, an der sich ihre positiven und negativen Überschußladungen im Gleichgewicht befinden (isoelektrischer Punkt). Bei geeigneter Zusammensetzung des Ausgangsgemisches bauen die Ampholyte einen linearen pH-Gradienten auf.

Gibt man zu diesen "Ampholinen" (Handelsname der Fa. LKB) weitere Ampholyte, z.B. Proteine, so wandern diese in einem derartigen pH-Gradienten ebenfalls an die Stelle, an dem sie elektrisch neutral, also ungeladen erscheinen.

Von diesem Verfahren gibt es eine präparative und eine analytische Modifikation.

Im ersten Falle baut sich der Gradient innerhalb eines Glasrohres auf, das mit einem Ampholine-haltigen

Saccharosegradienten gefüllt ist, dem auch das aufzutrennende Material beigegeben worden ist. Bei Anlegen einer Spannung bildet sich innerhalb einiger Stunden der pH-Gradient aus. Bei Ende des Versuchs, meist nach 48 bis 72 Stunden, wird die Flüssigkeitssäule über einen Fraktionsteiler entleert. Proteingehalt und pH der einzelnen Fraktionen können im Spektralphotometer bzw. am pH-Meter bestimmt werden.

Das analytische Verfahren wird - ähnlich einer Diskoelektrophorese - in PAA-Gelen mit großem Porendurchmesser (ca. 5-7 % Monomerkonzentration) durchgeführt, in die Ampholine und Proteinprobe einpolymerisiert bzw. auf die obere Gelgrenzfläche aufgetragen werden (u.a. HAYES und WELLNER, 1969). Nach Anlegen einer elektrischen Spannung bildet sich im Gel ein pH-Gradient aus (s.o.).

Am Ende eines derartigen Laufs, der nur wenige Stunden erfordert, können die Gele angefärbt oder in gleichmäßige Querscheibchen geschnitten werden, die dann mit Wasser eluiert werden. Proteinhaltige Lösungen können dann entweder durch Photometrieren bei 280 nm ermittelt werden oder - bei zu geringer Proteinkonzentration - über eine Diskelektrophorese bestimmt werden. Zugehörige pH-Werte können direkt am pH-Meter gemessen werden.

Beide Modifikationen dieser Technik wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandt. Sowohl im Falle des präparativen Verfahrens war ein Proteinpeak, als auch im Falle des analytischen eine Proteinbande, mit Coomassie Blue violett angefärbt, im PAA-Gel zu sehen.

Ebenso wurde in beiden Experimenten übereinstimmend als isoelektrischer Punkt für P_1 der Wert 7,23 ($\pm 0,05$) ermittelt (s. Abb. 10). Darüber hinaus hat auch dieses Verfahren einen weiteren Anhaltspunkt für die homogene Zusammensetzung der P_1 -haltigen Bio-Gel-Säulenfraktionen geliefert.

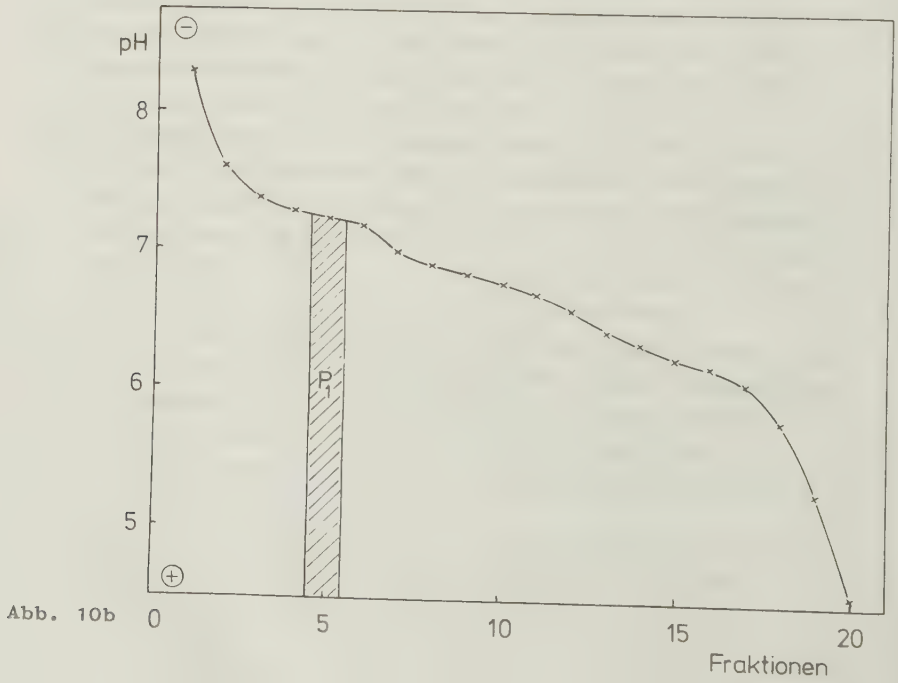
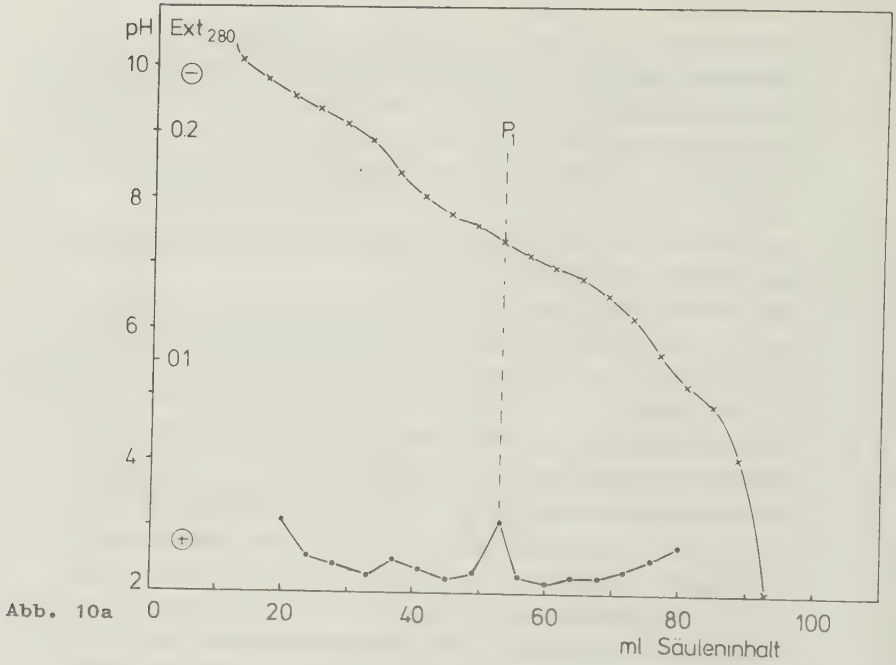


Abb. 10 Isoelektrische Auftrennung der Bio-Gel-Säulenfraktion

P₁ im Ampholytgradienten

- a) in der LKB-Säule (präparatives Verfahren; pH 5-8)
- b) im PAA-Gel-Stäbchen (analytisches Verfahren, pH 6-8)

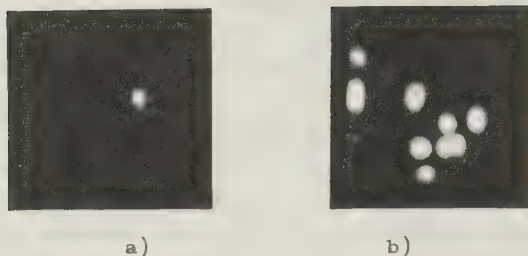
5) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Als ein weiteres Kriterium für die Reinheit der P₁-Fraktion wurde die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure herangezogen, ausgehend von der Überlegung, daß - bei ca. 20 möglichen Aminosäuren in dieser Position - weitere in P₁ vorkommende Polypeptide nur mit entsprechend geringer Wahrscheinlichkeit dieselbe Verbindung an dieser Stelle aufweisen sollten.

NEUHOFF, von der HAAR, SCHLIMME und WEISE (1969) haben ein von GRAY und HARTLEY (1963) angegebenes Verfahren um 3 Zehnerpotenzen empfindlicher gestalten können: Die N-terminale Aminosäure eines Proteins wird mit Dansylchlorid (5-dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl-chlorid) unter geeigneten Bedingungen umgesetzt und anschließend durch Hydrolyse abgespalten. Diese nun (als einzige fluoreszierende Dansylaminosäure aus dem Hydrolysat) wird - mit einem Referenzgemisch von Dansylaminosäuren auf der Rückseite einer doppelseitig beschichteten Polyamid-Dünnschichtplatte - einer zweidimensionalen Chromatografie unterworfen.

Im UV-Licht können die aufgetrennten grünlich-gelb aufleuchtenden Dansylaminosäuren leicht identifiziert werden. Auf diese Weise gelingt es, in kurzer Zeit weniger als 10^{-12} M einer beliebigen Aminosäure zu identifizieren.

Aus den beiden im UV-Licht aufgenommenen Fotografien der Abbildung 11 ist zu ersehen, daß sich in der Säulenfraktion P₁ nur eine dansylierte Aminosäure nachweisen läßt, und zwar G l y c i n.



a)

b)

Abb. 11 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure auf einer beidseitig beschichteten Polyamid-Dünnschichtplatte

- a) Vorderseite mit Dansyl- G l y c i n aus der Dansylierungsreaktion von P₁ (Auftragsstelle: rechte untere Ecke)
- b) Rückseite mit Dansylaminosäure-Gemisch (Auftragsstelle: linke untere Ecke; Dansyl-Asp, -Phe, -Pro, -Leu, -Tyr, -Ala, -Ser, -Ile, -Gly)

6) Aminosäureanalyse

Um das Bild abzurunden, wurde mit P₁ eine Aminosäureanalyse durchgeführt.

Mit einer derartig geringen Proteinmenge von 100-200 γ Polypeptid pro Aufarbeitung (Asciteszellen aus 5 Ratten) eine Aminosäureanalyse zu erhalten, war nur durch eine enorme Weiterentwicklung und Verfeinerung des von MOORE und STEIN (1954) angegebenen Verfahrens möglich: In jüngster Zeit war es KREJCI und MACHLEIDT (1969) gelungen, einen automatischen Analysator mit einem Materialbedarf von ca. 2 nM Aminosäuregemisch ("bis zu 25 pM pro Aminosäure können quantitativ bestimmt werden") in Betrieb zu nehmen. Das aufzutrennende Proteinhydrolysat wird an Ionenaustauscherharze in Kapillarsäulen adsorbiert und dann mit einem pH-Stufengradienten eluiert. Nach den Angaben von KREJCI und MACHLEIDT beträgt die mittlere Standardabweichung bei derartigen Bestimmungen ca. 2 %.

Bei einer Analyse von P₁ ergaben sich folgende Werte:

	Mol-%	Anzahl der Aminosäuren (Histidin = 1)
Asp	7,62	5,6
Thr	6,73	4,9
Ser	6,31	4,6
Glu	20,00	14,6
Pro	9,82	7,2
Gly	5,73	4,2
Ala	4,84	3,5
Val	1,89	1,4
Met	0,00	0,0
Ile	3,86	2,8
Leu	4,64	3,4
Tyr	(0,50)	(0,3)
Phe	2,53	1,8
Lys	19,74	14,5
His	1,37	1,0
Arg	3,62	2,7
	100,2 %	MG: 9.801 (rechnerisches Molekulargewicht)

Besonders auffällig sind dabei die Anteile der sauren und basischen Aminosäuren: Für Asparaginsäure 7,62 Mol%, für Glutaminsäure 20,0 Mol%, für Lysin dagegen 19,74 Mol%. Auch der Prolinanteil liegt mit 9,82 Mol% beachtlich hoch.

Aus dem Ergebnis der Aminosäureanalyse wurde für das Polypeptid P₁ rechnerisch ein Molekulargewicht von 9.800 ermittelt. Dieser Wert stimmt mit dem bei der Molekulargewichtsbestimmung nach der SDS-Methode (MG = 10.500, s. S. 28) gefundenen sehr gut überein.

7) Markierbarkeit der Polypeptide mit radioaktiver Nukleinsäure(-vorstufen)

a) Prüfung auf Bindungsaktivität für RNS in vitro

Zur Untersuchung der Polypeptide P_1 und P_2 auf Bindungsaktivität für RNS wurde der heute übliche Test von GIRARD und BALTIMORE (1966) angewandt, der auf folgendem Prinzip beruht:

Bestimmte Eiweißkörper haben die Fähigkeit, sich in annähernd neutralem (d.h. physiologischem) pH-Milieu an RNS komplexartig zu binden. In einem Testansatz wird nun radioaktiv markierte RNS mit der zu untersuchenden Proteinlösung inkubiert und anschließend langsam durch eine Cellulosenitratmembran gesaugt: Dabei werden Proteine und Protein-Nukleinsäure-Komplexe an das Filter adsorbiert, reine Nukleinsäure dagegen wird nicht zurückgehalten. Eine Messung der auf dem Filter verbliebenen Radioaktivität gibt Aufschluß über die Anwesenheit von Nukleinsäure-bindendem Protein im Testansatz.

Ein entsprechendes Experiment mit den Polypeptidfraktionen P_1 und P_2 aus der Bio-Gel-Trennung ergab ein negatives Resultat: An das Cellulosenitratfilter hatte sich keine signifikante Menge an Radioaktivität (in Form eines RNS-Proteinkomplexes) gebunden. Daraus mußte geschlossen werden, daß beide Polypeptide zumindest unter diesen Testbedingungen keine Ribonukleinsäure binden.

b) Bindung von Pyrimidin- bzw. Purinbasen in vivo

Da unbekannt war, ob die oben beschriebenen Versuchsbedingungen im speziellen Fall geeignet waren, wurde ein weiterer Test *i n v i v o* vorgenommen. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, daß sich bei einem derart stoffwechselaktiven und proliferierenden Gewebe wie Yoshida-Ascites an Proteine gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäurebausteine auch noch in sehr kleiner Menge

auffinden oder isolieren lassen müßten, falls sie überhaupt vorkommen.

Zu diesem Zweck wurde den mit Yoshida-Ascites behafteten Ratten Orotsäure-6- ^{14}C als Muttersubstanz für P y r i m i d i n - b a s e n intraperitoneal injiziert (Orotsäure $\rightarrow$ Orotidin-5'-phosphat $\rightarrow$ Uridin-5'-phosphat). Nach vier Stunden wurde die Ascitesflüssigkeit entnommen und daraus in der beschriebenen Weise P_1 und P_2 isoliert.

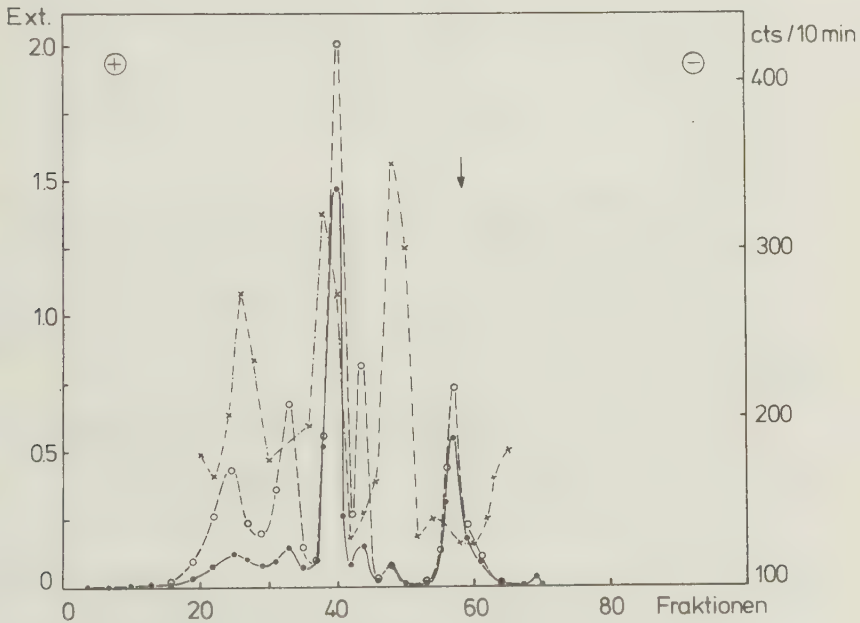


Abb. 12 Auftrennung der Acetonfällungsfraction (63-78 % Acetonkonzentration) nach in vivo-Markierung mit Orotsäure-6- ^{14}C in der trägerfreien Elektrophorese (pH 4,5; -o-o- Ext. 260; -●- Ext. 280; -x-x- Radioaktivität).

In den polypeptidhaltigen Fraktionen 55-60 ist keine signifikante Radioaktivität aufzufinden ("background": 120 cts/10 min).

Wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist, zeigte sich schon beim Reinigungsschritt der trägerfreien Elektrophorese, daß keine signifikante Radioaktivität ("background" bei 120 cts/10 min) mit den polypeptidhaltigen Fraktionen 55-60 auftritt. Demnach sind P_1 und P_2 nicht fähig, Uracil, Thymin oder Cytosin bzw. entsprechende Nukleotide in vivo zu binden.

In entsprechender Form wurde nach einer etwaigen Bindungsaktivität dieser Polypeptide für **P u r i n b a s e n** gesucht. Um möglichst eindeutige Ergebnisse zu erzielen, erschien es in diesem Falle günstig, anstatt einer gemeinsamen Vorstufe (Inosinsäure) direkt die Basen Guanin-8- ^{14}C bzw. Adenin-8- ^{14}C zu injizieren, die auf einem Seitenweg des Stoffwechsels in die Nukleoside und anschließend in Nukleotide umgewandelt werden können.

Im Verlauf dieser Versuche zeigten sich schon bei der Auftrennung der angereicherten Polypeptidfraktion in der trägerfreien Elektrophorese wesentliche Unterschiede im Bindungsvermögen der Polypeptide gegenüber den vorangegangenen Versuchen mit Orotsäure, die in einer Reihe von Versuchen (6) bestätigt wurden.

Aus den Abbildungen 13 und 14 geht hervor, daß sich bei Verabreichung von radioaktiv markiertem **G u a n i n** keine nennenswerte Radioaktivität in den polypeptidhaltigen VAP-Fraktionen finden läßt, im Falle von markiertem **A d e n i n** hingegen **b e t r ä c h t l i c h e R a d i o a k t i v i t ä t**. Eine Reelektrophorese der VAP-Fraktionen 53-58 (s. Abb. 15) bei pH 8,5 zeigte, daß auch unter diesen Bedingungen nur sehr geringe Mengen an Radioaktivität aus den polypeptidhaltigen Fraktionen 53-60 abzutrennen sind. Dieses Ergebnis deutet auf eine Bindung von markiertem Adenin an P_1 hin; ebenso das folgende: Etwa 50 % der in diesen Fraktionen aufgefundenen Radioaktivität ließen sich nach dem nächsten Reinigungsschritt, der Gelfiltration an Bio-Gel P10, zusammen mit P_1 nachweisen (ca. 300-500 cts/mg/min).

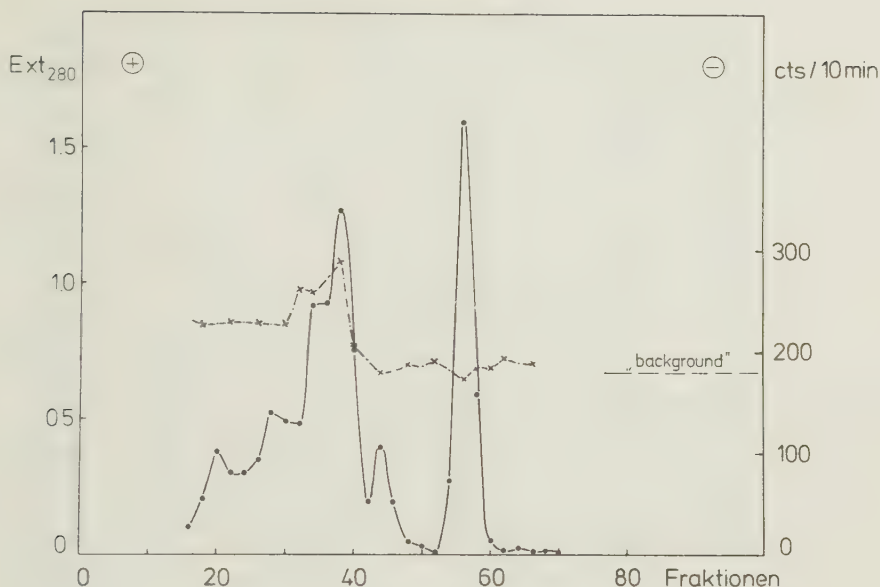


Abb. 13 Auftrennung der Acetonfällungsfraction (63-78 % Acetonkonzentration) nach in vivo-Markierung mit Guanin-8-¹⁴C in der trägerfreien Elektrophorese (pH 4,5; —●—●— Ext.₂₈₀; —X—X— Radioaktivität)
In den polypeptidhaltigen Fraktionen 55-60 ist keine signifikante Radioaktivität festzustellen

Abb. 14 Auftrennung der Acetonfällungsfraction (63-78 % Acetonkonzentration) nach in vivo-Markierung mit Adenin-8-¹⁴C in der trägerfreien Elektrophorese (pH 4,5; —●—●— Ext.₂₈₀; —○—○— Ext.₂₆₀; —X—X— Radioaktivität)
Über den polypeptidhaltigen Fraktionen 53-58 zeigt sich ein klar abgesetzter Peak von Radioaktivität (im oberen Teil der Abbildung wurde ein anderer Maßstab für die Radioaktivität der darunter liegenden Fraktionen 20-40 gewählt!)

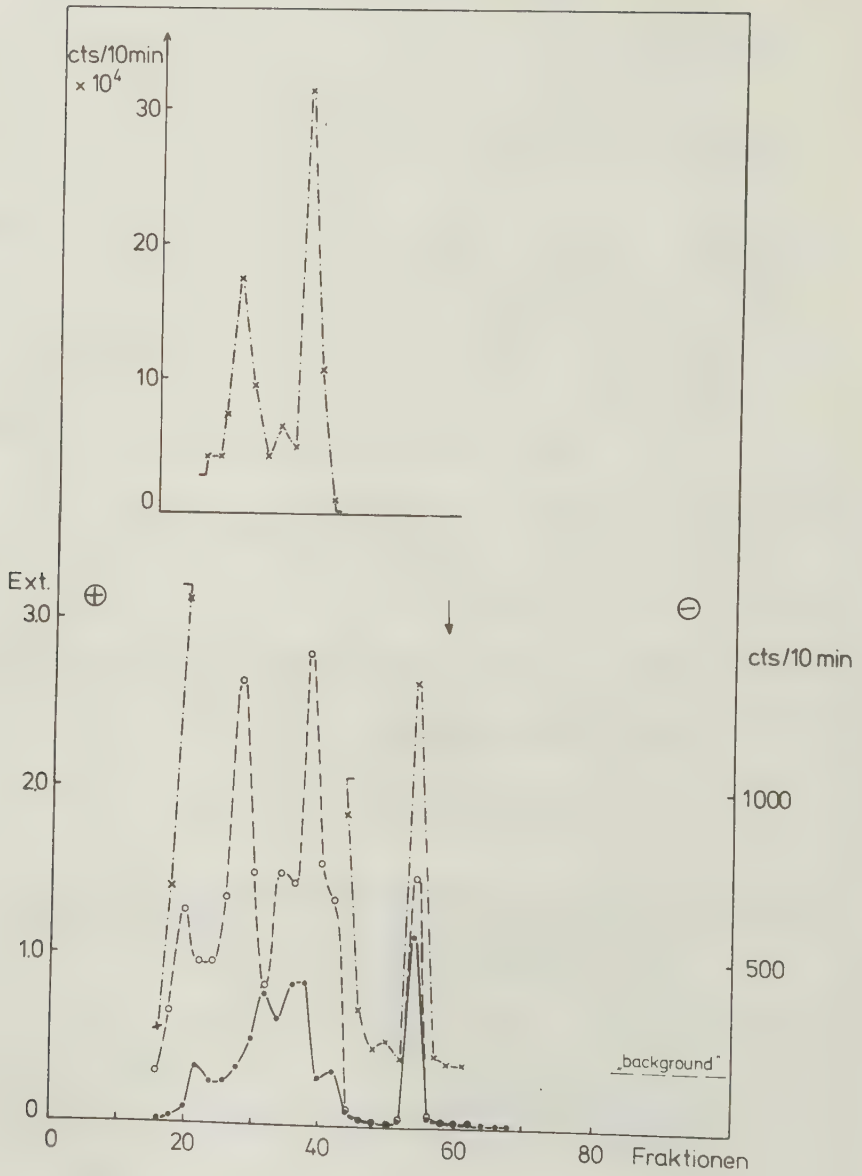


Abb. 14

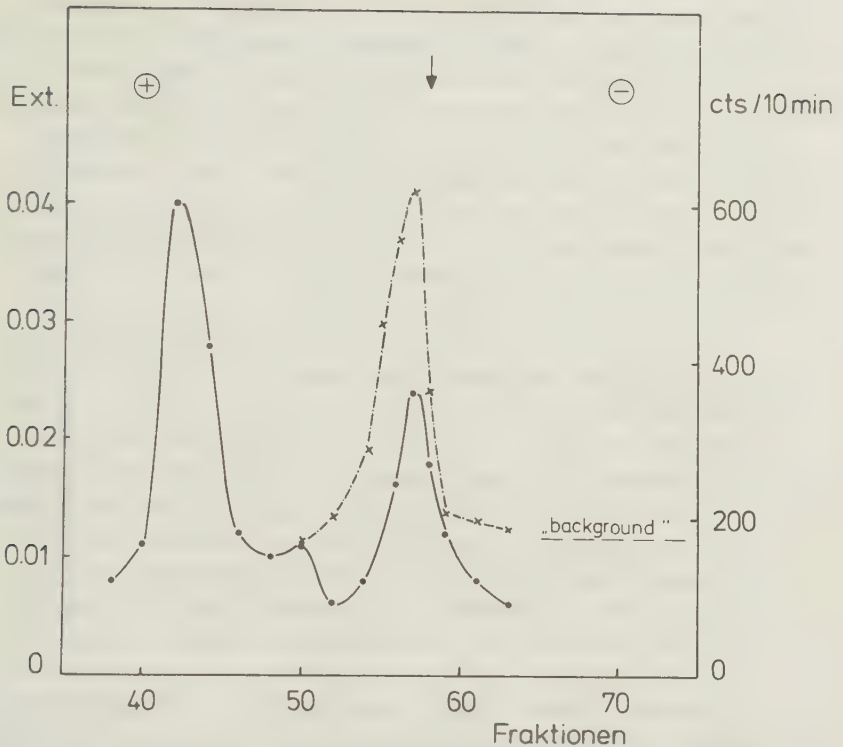


Abb. 15 Reoelektrophorese der VAP-Fractionen 53-58 (s. Abb. 14) bei pH 8,5 in der trägerfreien Elektrophorese (—●—●— Ext.₂₈₀; -X-X- Radioaktivität)
 Auch unter diesen veränderten Trennbedingungen wandert die Radioaktivität zusammen mit der Polypeptidfraktion (Fraktion 53-60).

c) Isotopenverdünnungsversuch

Von einem Abbauprodukt des Adenins, das in die Proteinbiosynthese eingeht, war bisher nichts bekannt; es lag nahe, bei diesem ungewöhnlichen Befund an eine Verunreinigung des verwendeten Adenin-8-¹⁴C zu denken, die entweder selbst oder als

im Zellstoffwechsel umgewandeltes Produkt in P_1 eingebaut worden ist. Eine derartige Verunreinigung könnte aus dem Herstellungsprozeß der markierten Verbindung stammen oder durch den Zerfall der radioaktiven Verbindung verursacht sein. Eine Reinheitsanalyse von Seiten des Herstellers aus jüngster Zeit (3 Monate vor Applikation) ließ den zuerst genannten Verdacht nicht gerechtfertigt erscheinen.

Um diese Fragen zu klären, wurde die sogenannte "Isotopenverdünnungstechnik" (neuere Literatur bei OLDHAM, 1971) angewandt.

Dabei wird die im Standardtest verwendete Menge einer radioaktiven Substanz durch Zugabe eines Vielfachen nicht markierter ("kalter") Substanz v e r d ü n n t appliziert. Im Falle einer r e i n e n Ausgangssubstanz (z.B. ^{14}C -Orotsäure) wird im untersuchten Endprodukt (z.B. RNS) sehr geringe Radioaktivität nachweisbar sein im Vergleich zu einem Versuch mit "unverdünnter" Ausgangssubstanz, da "heiße" und "kalte" Verbindung am gleichen Erfolgsort konkurrieren ("kompetitive Hemmung") und von den Stoffwechselpartnern wahllos eingebaut werden.

Im Falle einer v e r u n r e i n i g t e n Ausgangssubstanz dagegen liegt diese markierte Verunreinigung nach wie vor in gleicher Konzentration vor; dementsprechend ist auch die aus ihr stammende Radioaktivität im Endprodukt gleich hoch wie in einem Kontrollversuch.

Bei Verwendung eines 50-fachen Überschusses an "kaltem" Adenin gegenüber der markierten Verbindung ergab sich folgendes Bild beim Reinigungsschritt der trägerfreien Elektrophorese: (s. Abb.16).

In Abbildung 16 zeigt sich in den polypeptidhaltigen Fraktionen 55-60 noch deutlich ein kleiner Peak an Radioaktivität - deutlich gegen den "background" abgesetzt. Gegenüber einem Kontrollversuch mit "heißem" Adenin spiegelt sich auch in etwa das Verhältnis "kaltes" Adenin/"heißes" Adenin = 45:1 (Versuchsergebnisse normiert) der eingesetzten Menge wieder, entsprechend der Erwartung für nicht verunreinigtes Adenin.

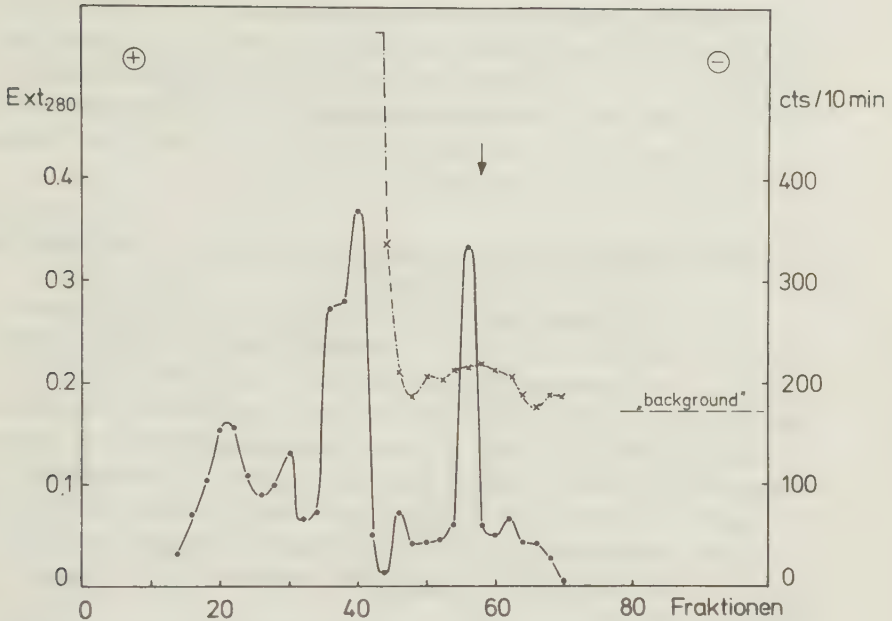


Abb. 16 Auftrennung der Acetonfällungsfraction (63-78 % Acetonkonzentration) nach in vivo-Markierung mit Adenin-8-¹⁴C/Adenin wie 1:50 (Isotopenverdünnungsmethode)

(—•—•— Ext.₂₈₀; —X—X— Radioaktivität; pH 4,5)

Im Bereich der polypeptidhaltigen Fraktionen 55-60 ist ein keiner Radioaktivitätspeak zu erkennen (vgl. Abb. 14).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht weiter untersucht werden, ob es sich bei dem an das Polypeptid gebundenen "Adenin" um die Base selbst, oder eines ihrer Abbauprodukte Inosin, Hypoxanthin, Xanthin handelt, bzw. ob es als Nukleosid, Nukleotid, oder Triphosphat vorliegt; hierzu erschienen weitere Markierungsversuche bzw. umfangreiche chromatographische Analysen notwendig, die auf Grund der geringen isolierten Substanzmengen große Schwierigkeiten bereiten würden.

LAYNE (1957) bestimmt den Nukleinsäuregehalt eines Proteins aus dem Extinktionsverhältnis $\text{Ext.}_{260 \text{ nm}}/\text{Ext.}_{280 \text{ nm}}$; wendet man dieses Verfahren auf P_1 an, so ergibt sich aus dem Wert 1,25 (s. Abb. 8) ein "Nukleinsäuregehalt" von 6,5 %, entsprechend zwei Adenin in Form des Nukleotids, bzw. fünf Adenin in Form der Base pro Molekül P_1 .

d) Untersuchungen zur Natur der Bindung Protein-organische Base

Zur weiteren Klärung der Frage, in welcher Weise Adenin an P_1 gebunden vorliegt, wurde der radioaktiv markierte P_1 -Adenin-Komplex verschiedenen Trennverfahren unterworfen.

Naheliegender erschien eine Bindung der organischen Base an das Polypeptid durch elektrostatische Anziehungskräfte bzw. über Wasserstoffbrücken, vergleichbar dem Aufbau der Ribosomen. Diese "Kontakte" sollten sich bei geeigneter hoher Ionenstärke bzw. bei hoher Harnstoffkonzentration lösen lassen und damit eine Trennung der am Komplex beteiligten Komponenten im elektrischen Feld ermöglichen.

Wiederum bot sich das Verfahren der trägerfreien Elektrophorese an, mit der es (in der Ausführung nach HANNIG) möglich ist, proteinhaltige Lösungen zwar nicht bei relativ hoher Ionenstärke, aber doch bei hoher Harnstoffkonzentration aufzutrennen.

In diesem Falle wurde eine Trennung bei pH 4,5 und 4 M Harnstoffkonzentration durchgeführt. Ein Vergleich von Abb. 14 mit Abb. 17 zeigt, daß P_1 und P_2 nahezu unverändert in den Fraktionen 52-64 erscheinen. In diesen Fraktionen sind zugleich mehr als 80 % der in die Trennkammer eingespritzten Radioaktivität vorhanden. In den Fraktionen 34-44, die nach Kontrollversuchen evtl. abgetrennte Adenylsäure enthalten müßten, ließ sich keine signifikante Radioaktivität nachweisen. Auffällig ist, daß der Bereich der Fraktionen 52-64 keine einheitliche Verteilung in Form einer Gauß'schen Kurve aufweist, sondern aus zwei sich überlappenden Peaks zusammengesetzt erscheint. Dieser Befund wird sowohl durch die Meßwerte für Ext._{280} als auch für Radioaktivität unterstützt. Wie aus

quantitativen Untersuchungen von Diskelektrophoresestäbchen (mit Auftrennung der einzelnen VAP-Fractionen) im "Chromoscan" hervorgeht, liegt jedoch keine ins Auge fallende Auftrennung von P_1 und P_2 vor, die eine Deutung dieses Phänomens zuließe.

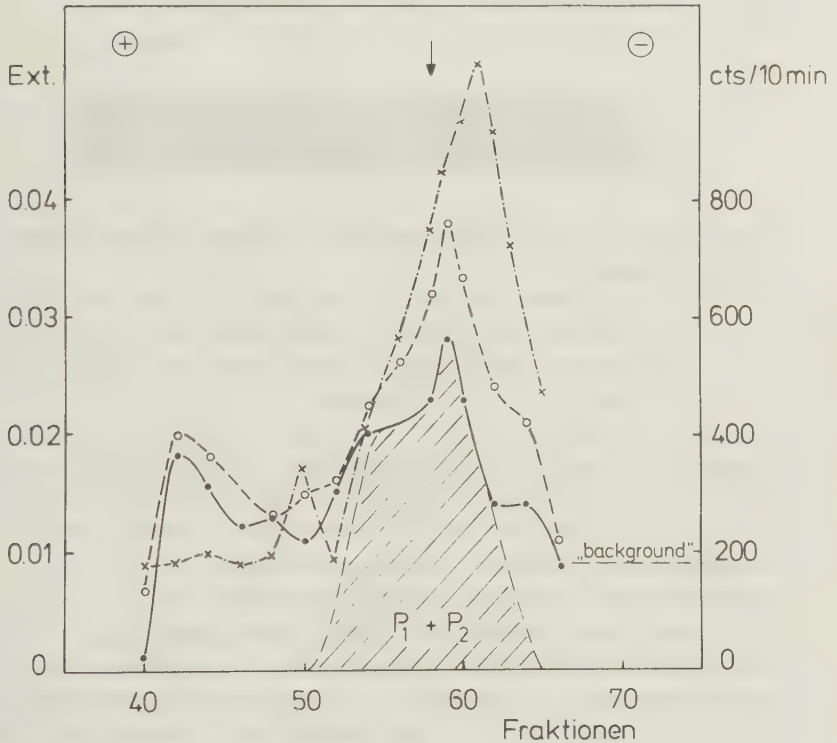


Abb. 17 Auftrennung der VAP-Fractionen 53-58 (s. Abb. 14) in der trägerfreien Elektrophorese bei 4 M Harnstoffkonzentration (pH 4,5; —●—●— Ext. 280; —○—○— Ext. 260; —x—x— Radioaktivität)

Der größte Teil der in die Trennkammer eingespritzten Radioaktivität (ca. 80 %) bleibt im Bereich der polypeptidhaltigen Fraktionen 52-64.

Eine weitere Auftrennung des " P_1 -Adenin"-Komplexes in Gegenwart von 8 M Harnstoff wurde mit dem schon beschriebenen Diskelektrophoreseverfahren bei pH 4,5 versucht. Zusätzlich zu diesen noch extremeren Milieubedingungen sollte die Siebwirkung des Gels zu einer etwaigen Auftrennung der Komplexkomponenten beitragen.



Abb. 18 Autoradiografie eines Diskelektrophoresestäbchens (Negativ):

Aufgetrennt wurden die Kernsaftproteine aus Yoshida-Asciteszellen nach in vivo-Markierung mit Adenin-8- ^{14}C . Nur eine (hell erscheinende) Bande ist im Bereich des Polypeptids P_1 zu erkennen.

Die Autoradiografie eines derartigen PAA-Diskstäbchens zeigt nur eine deutlich geschwärmte (im Negativ: weiße Bande; s. Abb. 18) Bande und zwar in Höhe der P_1 -Bande eines in üblicher Weise angefärbten Diskstäbchens.

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch die Kernsaft-Fraktion aufgetrennt: auch hier zeigte sich bei der autoradiographischen Analyse nur eine Bande, die mit der P_1 -Bande übereinstimmt. Die Polypeptidkomponente P_2 bewies also auch hier (wie schon auf Grund ihrer spektralen Eigenschaften vermutet - s. S. 24) keine Bindungsaktivität für Adenin.

IV. Versuche zur Lokalisierung des isolierten Polypeptides in weiteren nukleinsäurehaltigen Zellkompartimenten

Nach den beschriebenen Ergebnissen erschien eine nähere Lokalisierung von P_1 innerhalb der Asciteszelle interessant, da sich daraus u.U. ein Hinweis auf eine mögliche Funktion des Polypeptids ergeben könnte.

Wie oben (S.14) erläutert, wurde P_1 zuerst in r o h e n K e r n e x t r a k t e n (mit Hilfe der Diskelektrophorese) aufgefunden. Später wurde das Polypeptid jedoch aus dem G e s a m t h o m o g e n a t isoliert. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Präparationsverfahren gelang es, auch aus den Zellkernen selbst P_1 zu isolieren, und zwar ca. 35 % der sonst aus dem Gesamthomogenat anfallenden Menge (s. S. 22). Es lag nahe, die Isolierung von P_1 aus weiteren Zellkompartimenten mit Nukleinsäuregehalt zu versuchen: aus den M i k r o s o m e n, die in Form der Ribosomen und Polysomen r-RNA und m-RNA, aber auch DNA (SCHNEIDER und KUFF, 1969) enthalten sollen, sowie aus den R i b o s o m e n selbst.

Eine Präparation von M i k r o s o m e n wurde in einem modifizierten Verfahren nach de DUVE et al., (1955) durchgeführt. Ihre Extraktion mit gepufferter NaCl-Lösung sowie die weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten auf dem für die P_1 -Isolierung aus dem Gesamthomogenat angegebenen Weg (s. auch MATERIAL UND METHODEN: 1c) - 5)).

Auch in diesem Falle ließen sich geringe Mengen (einige μg) an P_1 isolieren, wie eine Analyse mit der "split-gel"-Methode gezeigt hat.

R i b o s o m e n aus Asciteszellen wurden in Anlehnung an die Methode für Rattenleber-Ribosomen gereinigt, wie sie BIELKA et al. (1968) beschrieben haben. In einem NaCl-Extrakt der Ribosomen, die bis zu diesem Schritt in ungepufferter Saccharoselösung gehalten worden waren, ließ sich im Gegensatz zu den Mikrosomen P_1 nicht nachweisen.

V. Vergleich mit einem Leberpolypeptid: Isolierung-Elektrophoretisches Verhalten - Molekulargewicht - Aminosäureanalyse

Wie in der Einleitung erwähnt, waren auffällige Polypeptide mit hoher Absorption bei 260 nm ursprünglich in Rattenleberhomogenaten (HERP, LISKA, PIGMAN, VITTEK, 1970) aufgefunden worden. Sie hatten den Anstoß zu den vorliegenden Untersuchungen an den Ascites-Polypeptiden P_1 und P_2 gegeben, die sich mit der "split-gel"-Methode nicht von ersteren hatten unter-

scheiden lassen.

Von diesem Befund ausgehend wurde die Frage geprüft, ob es sich bei den bisher nicht näher untersuchten Leber-Polypeptiden um Eiweißkörper mit vergleichbaren Eigenschaften handeln könnte. Dazu wurden mehrere, im Verlauf dieser Arbeit angewandte Kriterien zu deren Identifizierung und Charakterisierung untersucht.

Das Hauptinteresse richtet sich auch hier auf die am stärksten kathodisch wandernden Proteine, insbesondere auf jene Komponente, die schon in früheren Versuchen gleiche Wanderungseigenschaften bei der analytischen Diskelektrophorese wie Ascites- P_1 gezeigt hatte (s.o.). Eine Anreicherung und Isolierung dieses Proteins gelang in der für das Ascites-Polypeptid angegebenen Weise, wenn auch noch nicht in ebenso hohem Reinheitsgrad: 65-75 % gegenüber 85-90 % bei der Asciteskomponente (bezogen auf Chromoscananalysen der angefärbten Diskstättchen bei 580 nm: s. S. 22). Daraus geht unter anderem hervor, daß sich auch beim Reinigungsschritt der trägerfreien Elektrophorese keine Unterschiede zeigen im Wanderungsverhalten der beiden Substanzen P_1 und P_1' (s. Abb. 20).

(+)



(-)

Abb. 19 Diskelektrophoretische Auftrennung der Kernsaftproteine aus Rattenleberkernen bei pH 4,5 (10 % PAA-Gel)

Ein entsprechender Befund ergab sich bei der Bestimmung des Molekulargewichts nach der SDS-Methode (s. Abb. 9c): Mit einem ermittelten Molekulargewicht von 10.500 ($\pm$ 400) liegt auch dieser Wert innerhalb der Fehlergrenze des für Ascites- P_1 angegebenen Wertes.

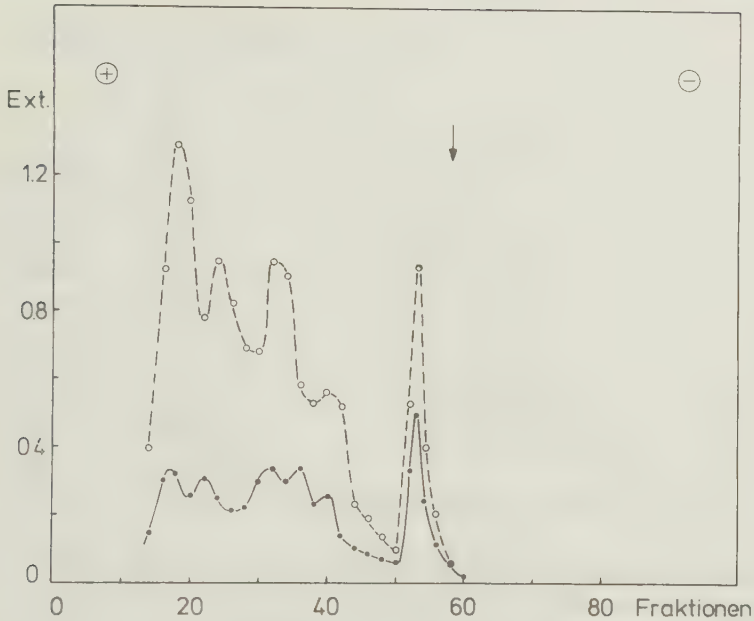


Abb. 20 Auftrennung einer Acetonfällungsfraction (63-78 % Aceton)
aus Rattenleber in der trägerfreien Elektrophorese
 (pH 4,5; -●-●-Ext.₂₈₀; -○-○-Ext.₂₆₀)
 Auch hier enthalten die Fraktionen 53-59 Polypeptide.

Deutliche Unterschiede zeigen sich dagegen bei der Aminosäureanalyse:

	Leber: P ₁ '	Ascites: P ₁
Aminosäuren	Mol%	Mol%
Asp	10,48	7,62
Thr	7,32	6,73
Ser	5,67	6,31
Glu	11,73	20,00

Pro	2,44	9,82
Gly	7,68	5,73
Ala	5,73	4,84
Val	5,38	1,89
Met	0,00	0,00
Ile	4,42	3,86
Leu	7,82	4,64
Tyr	(0,65)	(0,50)
Phe	3,04	2,53
Lys	17,98	19,74
His	2,54	1,37
Arg	5,07	3,62

97,95 %

100,20 %

Rechnerisches MG:

Rechnerisches MG:

10.748

9.801

(bezogen auf Histidin = 2)

(bezogen auf Histidin = 1)

Wie aus der Gegenüberstellung hervorgeht, ist bei beiden Polypeptiden hoher Gehalt an Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin festzustellen; große Unterschiede zeigen sich dagegen - bei annähernd gleichem Molekulargewicht (s. S. 27) im Valin-, Leucin- und Prolinanteil. Gerade der Prolinanteil jedoch beeinflusst die Sekundär- und damit meist auch die Tertiärstruktur eines Proteinmoleküls, die eng mit seiner Funktion zusammenhängen (s. auch EINLEITUNG, S. 3).

Auf Grund dieser wesentlichen Differenzen unterblieb die Ausarbeitung einer Markierungsmethode mit radioaktiven Nukleinsäurebausteinen, da unter diesen Umständen nicht mehr mit vergleichbaren Eigenschaften der beiden Polypeptide gerechnet werden konnte.

DISKUSSION

1) Nukleinsäure-bindende Proteine

In den vergangenen Jahren fanden Arbeiten über Komplexe nicht-ribosomaler RNS mit Proteinen bzw. über RNS-bindende Proteine beträchtliches Interesse im Zusammenhang mit den Vorgängen bei der Transkription in der Zelle.

SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1966) hatten im Zellkern Komplexe aus schnell markierbarer RNS und Proteinen aufgefunden, deren Proteinanteil u.a. die Funktion haben soll, die neu synthetisierte RNS dem vorzeitigen Angriff der RNase zu entziehen. Vergleichbare Strukturen wurden von SPIRIN und NEMER (1965) im Cytoplasma von Seeigeln nachgewiesen, die dafür die - inzwischen verbreitete - Bezeichnung "Informosomen" vorgeschlagen haben.

Später wurden auch Eiweißkörper aus dem cytoplasmatischen Bereich bekannt, die in vitro-Bindungsaktivität für nicht-ribosomale RNS zeigen (SAMARINA, LUKANIDIN, MOLNAR, and GEORGIEV, 1968). Die Isolierung derartiger Proteine aus Mikrosomen (SAMEC, JACOB and MANDEL, 1968), Polyribosomen (CARTOUZOU, POIREE and LISSITZKY, 1969) und Cytosol (SCHWEIGER und HANNIG, 1971) läßt möglicherweise ihren Weg in der Zelle erkennen: (Synthese an den Polyribosomen) - Vorkommen im Cytosol - Bindung an neu-synthetisierte RNS im Kern - "Informosomen" im Cytoplasma - Bindung des Komplexes an die Ribosomen des ER ("Mikrosomen").

Zumeist wurde für diese Eiweißkörper ein Molekulargewicht von 40-45.000 (oder ein Vielfaches davon) ermittelt: demnach handelt es sich um durchschnittlich große Eiweißkörper, die nicht mehr zu den Polypeptiden im eigentlichen Sinne gezählt werden können.

Ein ähnliches Molekulargewicht wurde auch für eine RNS-bindende Proteinkomponente aus Rattenleber-Cytosol festgestellt, das auch DNS in vitro binden und aus einer Lösung auszufällen vermag (SCHWEIGER und SPITZAUER, zur Publikation angenommen, 1972).

Eine der wesentlichen Aufgaben der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob im Bereich der kleineren Proteine oder Polypeptide Komponenten existieren, die Nukleinsäure - oder deren Vorstufen - binden können. Es erschien allerdings fraglich, ob derart kleine Proteine überhaupt eine Träger- oder Schutzfunktion (z.B. gegen Enzymangriff) für Makromoleküle wie DNS oder die verschiedenen RNS-Spezies ausüben vermögen, wenn man einmal von den seit längerer Zeit bekannten Protaminen und Histonen absieht, die in hoher lokaler Konzentration im Zellkern gebunden vorkommen und untereinander offenbar in komplexer Wechselbeziehung stehen (neuere Literatur bei HARBERS und VOGT, 1966).

2) Isolierung der Polypeptide P₁ und P₂

Zur Isolierung von Nukleinsäure(-vorstufen)-bindenden Polypeptiden wurde von Zellkernen ausgegangen, in der Erwartung, daß derartige Makromoleküle am ehesten am Synthesort von DNS und RNS zu finden seien, wenn sie eine Transport- oder Regulator-Funktion erfüllen sollen. Ein rasch wachsendes Gewebe wie Yoshida-Ascites schien für derartige Untersuchungen besonders geeignet.

Erste Schwierigkeiten brachte jedoch schon die Isolierung von Zellkernen mit sich. Die Asciteszellen ließen sich nur dann annähernd quantitativ aufbrechen, wenn eine Modifikation der Methode von PENMAN (1966) angewandt wurde: PENMAN empfiehlt, HeLa-Zellen zuerst in hypotonischer Kochsalzlösung quellen zu lassen, bevor sie mit einem "precision bore, stainless steel ball homogenizer" homogenisiert werden.

In Übereinstimmung mit PENMAN ergab sich auch für Yoshida-Ascites die "clearance" des Homogenisators als kritischer Faktor, im vorliegenden Fall: der Querschnitt der Ringdüse am Emanuel-Chaikoff-Homogenisator. Nur eine Spaltweite von 17 μm brachte befriedigende Resultate im Fall der offensichtlich sehr stabilen Asciteszellen (EMANUEL und CHAIKOFF (1957) empfehlen diese Bedingungen zur Isolierung von Mikrosomen und Mitochondrien, für die vergleichsweise kleineren Leberkerne jedoch 28 μm).

Abgesehen von dem bereits erwähnten Dichteverhältnis von Zellkern und zytoplasmatischen Strukturen (s. S. 10), das eine Isolierung der Kerne nach der Chauveau-Methode nicht erlaubt, zeigen Asciteskerne auch nach ausgiebigem Waschen geringe zytoplasmatische Anteile an der Oberfläche, die im Phasenkontrastmikroskop noch erkennbar sind. Leberkerne dagegen zeigen eine glatte, saubere Oberfläche, wie auch das Elektronenmikroskop bestätigt. Volumenmäßig dürften die Verunreinigungen der Asciteskerne bei späteren Extraktionsschritten zur Gewinnung löslicher Kernproteine allerdings kaum ins Gewicht fallen.

DOUNCE und ICKOWICZ (1969) haben den Einfluß der Vorbehandlung von Zellkernen auf die Ausbeute an globulären Proteinen, Histonen und "Residualproteinen" quantitativ zu analysieren versucht: Sie kamen zu dem Ergebnis, daß eine Isolierung von Zellkernen in 0,32 M Saccharose/2 mM $MgCl_2$ bei pH 6,8 (LAZARUS und SPORN, 1967) einen hohen Anteil extrahierbarer Kernsaftproteine liefert. Diese Bedingungen wurden somit in den beschriebenen Versuchen weitgehend eingehalten, wenn auch der pH-Wert in den ungepufferten Waschlösungen nicht kontrolliert wurde; durch fortschreitende hydrolytische Vorgänge im Homogenat stellt sich ein leicht saures Milieu von selbst ein.

Die isolierten Zellkerne wurden anschließend bei pH 8,5 extrahiert, da sich bei diesem pH - in Übereinstimmung mit SCHWEIGER und HANNIG (1971) - eine höhere Ausbeute an Kernsaftproteinen erreichen ließ; zugleich wird eine Verunreinigung mit den "leicht extrahierbaren Histonen" (DOUNCE und ICKOWICZ, 1969) vermieden. Die "klassischen" Histone und "saure Kernproteine" (neuere Literatur bei WANG und JOHNS, 1968) gehen bei physiologischer NaCl-Konzentration nicht in Lösung.

Nach der anschließenden Acetonfällung wurde die angereicherte Polypeptidfraktion nicht mehr in alkalischem Puffermilieu aufgelöst, sondern in dem flüchtigen Ammoniumformiatpuffer pH 4,5. Unter diesen Bedingungen wurden die Komponenten in der trägerfreien Elektrophorese zudem etwas besser aufgetrennt als bei pH 8,5, während die Gesamtverteilung mehr oder weniger un-

verändert blieb (s. S. 18 bzw. S. 39): Eine Auftrennung des auf diese Weise vorgereinigten Polypeptidmaterials war schließlich an Bio-Gel zu erreichen. Die isolierten Komponenten P_1 und P_2 zeigten nur sehr geringfügige Verunreinigungen (s. S. 22).

Berücksichtigt man ein Ergebnis dieser Arbeit, nämlich daß sich beispielsweise das Polypeptid P_1 zu 30-40 % aus dem Kernraum, zu 60-70 % aus dem Cytosol isolieren läßt (s. S. 22), so kommt man zu dem Schluß, daß dieser Eiweißkörper offensichtlich in der ganzen Zelle vorkommt. Geringe zytoplasmatische Verunreinigungen des Kernpräparats bzw. in den Kern diffundierte Proteinkomponenten dürften jedenfalls nicht für einen derart hohen P_1 -Anteil im Zellkern verantwortlich sein.

Alle derartigen Relationsangaben können jedoch nur als "Näherungswerte" angesehen werden, bezogen auf das i s o l i e r t e Endprodukt P_1 ; eine Ermittlung der ursprünglichen Konzentration im Homogenat sowie eine quantitative Verfolgung der Anreicherung war bei diesem Peptid nicht möglich, da hier nicht - wie bei einem Enzym - eine bekannte Funktion gemessen werden konnte.

Eine quantitative Verfolgung der einzelnen Präparationsschritte auf der Basis der jeweiligen Proteinverteilung erschien ebenfalls nicht möglich: Vom Homogenat bis zur Auftrennung in der trägerfreien Elektrophorese sind in den Proteingemischen eine Reihe von anderen Komponenten enthalten, die eine Bestimmung nach LOWRY grundlegend verfälschen (Zucker usw.; neuere Literatur bei VALLEJO und LAGUNAS, 1970).

Die Proteinbestimmung nach KUNO und KIHARA (1967) bietet hier keine Alternative: Eigene Versuche (unveröffentlicht) haben ergeben, daß diese Methode wenig störungsanfällig und für durchschnittlich große Proteine hervorragend geeignet ist, bei Polypeptiden mit einem Molekulargewicht unter 10.000 jedoch versagt; offensichtlich kommt eine Bindung der niedermolekularen Substanzen an die Cellulosenitrat-Membranen nicht zustande.

3) Eigenschaften und mögliche Funktionen der isolierten
Peptide P₁ und P₂

Von den Bio-Gel-Säulenfraktionen P₁ und P₂ kann nach den vorliegenden Ergebnissen (analytische Diskelektrophorese, Bestimmung des Molekulargewichts, Bestimmung des isoelektrischen Punkts, Ermittlung der N-terminalen Aminosäure) mit einiger Sicherheit gesagt werden, daß sie bisher nicht isolierte Peptidkomponenten hohen Reinheitsgrades enthalten. Dies gilt mit Vorbehalt für eine entsprechende Eiweißkomponente (P₁') aus Leber.

Die Polypeptidkomponente P₂ (Ascites) aus der Bio-Gel-Trennung fällt vor allem durch ihr niedriges Molekulargewicht (5.600) auf, wie es sonst nur noch von Hormonen, Antibiotika (s. S. 3), oder den "miniproteins" aus Membranen (MG 5.700; LAIKO, RUOSLAHTI, PAPERMASTER und DREYER, 1970) bekannt ist. Bei den letzteren handelt es sich um Eiweißkörper, die offenbar erst bei einer Extrahierung der Lipide aus den Membranen freigesetzt werden, während es sich bei P₂ - analog zu P₁ - anscheinend um ein lösliches Protein des Kern- bzw. Zellsafts handelt.

Das Ergebnis des SDS-Verfahrens für P₁ (MG 10.500) und das rechnerisch aus der Aminosäureanalyse ermittelte Molekulargewicht (MG 9.800) stimmen gut überein, vor allem, wenn man berücksichtigt, daß möglicherweise im Molekül vorhandenes Tryptophan, Cystein sowie Aminogruppen an Glutamin- und Asparaginsäure miteinbezogen werden müssen.

Wenngleich P₁ hohen Lysingehalt aufweist, wie er sonst nur von Chromatin-Proteinen bekannt ist (JOHNS, 1967; WANG und JOHNS, 1968), charakterisieren es Aminosäurezusammensetzung (saure Aminosäuren/basische Aminosäuren wie 1,1:1) und isoelektrischer Punkt ($I_{EP} = 7,23$) als annähernd neutrales Peptid; die letztere kleine Differenz dürfte ihre Erklärung darin finden, daß Glutaminsäure und Asparaginsäure zumindest zum Teil als Glutamin bzw. Asparagin vorliegen (s.o.).

Auffällig ist noch der hohe Prolingehalt von 9,82 Mol-%, der auf eine komplizierte Tertiärstruktur des Gesamtmoleküls mit geringem α -Helixanteil hinweist. Dieser Aspekt und weitere Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung (s. S. 47) dürften den Schluß zulassen, daß die Bio-Gel-Säulenfraktion P_1' aus Rattenleberkernen trotz einer Reihe von Übereinstimmungen entweder nicht mit P_1 aus Ascites-Zellen vergleichbar ist oder nicht homogen zusammengesetzt ist. Weitere Untersuchungen, vor allem hinsichtlich der in vivo-Bindungseigenschaften des Leberpeptids könnten dies klären.

Am isolierten Polypeptid P_1 aus Yoshida-Ascites war es zum erstenmal möglich, der Ursache für die spektrale Anomalie - höhere UV-Absorption bei 260 nm als bei 280 nm - nachzugehen, über die HERP et al. (1970) im Zusammenhang mit der Auftrennung eines "Ultrafiltrats" aus Rattenleber (s. S. 4) berichtet hatten. Leider lassen die Ergebnisse dieser Autoren keinen direkten Vergleich mit den hier beschriebenen Befunden zu, da sich Aminosäureanalysen und weitere Angaben meist auf stark heterogene Peptidfraktionen beziehen. Dies ist umso bedauerlicher, da sich - analog zu dem von ihnen beschriebenen Verfahren - aus einem g e k o c h t e n Asciteshomogenat die Polypeptidkomponente P_1 ohne Schwierigkeiten isolieren läßt, wenn man den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Weg (Acetonfällung, trägerfreie Elektrophorese, Gelfiltration) einhält (SPITZAUER, 1971, unveröffentlicht).

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß das Polypeptid P_1 aus Ascites mit hoher Wahrscheinlichkeit in vivo und in vitro weder RNS noch Pyrimidinnucleotide zu binden vermag im Gegensatz zu den bisher bekannten "Informosomen"-Proteinen (SPIRIN und NEMER, 1965) und vergleichbaren Eiweißkörpern aus dem Zytoplasma (neuere Literatur bei SCHWEIGER und HANNIG, 1971). Dagegen kann es in Anwesenheit von ^{14}C -Adenin in vivo markiert werden.

Neben dem UV-Spektrum, das auf die Anwesenheit einer bei 260 nm stark absorbierenden Substanz schließen läßt, erscheint die Spezifität bemerkenswert, nur die organische Base A d e n i n oder eines ihrer Umwandlungsprodukte, nicht aber Guanin bzw. ein Guaninderivat zu binden. Daß die Markierung mit 8-¹⁴C-Adenin wirklich auf einer "Bindung" beruht und nicht durch Verunreinigungen der verabreichten radioaktiven Substanz zustandekommt, die z.B. in das Peptid selbst eingebaut wurden, bestätigt der Isotopenverdünnungsversuch; zudem ist kein Abbauprodukt des A d e n i n s bekannt (im Gegensatz zu Pyrimidinnucleotiden), das in den Aminosäurestoffwechsel eingeht. Mit relativ hoher spezifischer Markierung des "Adenin-P₁-Komplexes" (ca. 300-500 cts/mg/min) bei niedrigem background dürften schließlich wesentliche Voraussetzungen gegeben sein, die nach OLDHAM (1971; Radiochemical Centre, Amersham) eine eindeutige Beurteilung eines derartigen Experiments zulassen. Zudem kommt eine Verfälschung des Ergebnisses durch den Einbau radioaktiven Materials in eine Verunreinigung von P₁ (z.B. in Form von Nukleinsäurebruchstücken oder Nukleotiden, adsorbierte Adeninabbauprodukte, Harnsäure bzw. Allantoin) nach der Gelfiltration an Bio-Gel P10 kaum noch in Frage.

Ferner wurde gezeigt, daß sich die radioaktive Komponente auch bei einer Reelektrophorese bei pH 4,5 in Gegenwart von 4 M Harnstoff nicht abtrennen läßt (s. S.42), auch nicht bei 8 M Harnstoffkonzentration in der analytischen Diskelektrophorese (s. S. 44). Demnach handelt es sich vermutlich nicht um eine ionogene Bindung, wahrscheinlicher jedoch um hydrophobe Wechselwirkungen, sterische Effekte, oder um eine homöopolare Bindung, wie sie HUANG und BONNER (1965) für die Bindung von Dihydrouridin an Histone diskutieren.

In bisherigen Untersuchungen wurde noch nicht geprüft, ob Adenin möglicherweise als Nucleotid an Serin bzw. Threonin gebunden vorliegt, d.h. in Form eines Phosphorsäureesters. Eine Verminderung der spezifischen Radioaktivität von P₁ um ca. 50 % im Verlauf der beiden letzten Reinigungsschritte (VAP und Gelfiltration) läßt eine solche Hypothese allerdings nicht

unbedingt stichhaltig erscheinen. Für die letztere Erscheinung könnte entweder der Einfluß der Gelmatrix oder die Vorbehandlung des Polypeptids durch Gefriertrocknung verantwortlich sein. Eine enzymatische Spaltung in den VAP-Fractionen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Wie schon erwähnt, ließ sich das Polypeptid P_1 zwar aus dem Zellkern, nicht aber aus anderen Strukturen, die Nukleinsäure enthalten, in signifikantem Ausmaße isolieren. Seine Zuordnung zu den bei physiologischen Bedingungen löslichen Proteinen läßt an eine Funktion denken, die möglicherweise mit dieser freien Beweglichkeit zusammenhängt: etwa eine Transportfunktion für Adenin selbst oder davon abgeleitete Verbindungen. Bei der offensichtlich sehr festen Bindung des Purinkörpers an das Polypeptid müßte allerdings ein enzymatischer Mechanismus gefordert werden, der diese Bindung lösen bzw. knüpfen kann; bisher bekannte "carrier"-Proteine für aktiven Galactose- bzw. Leucin-Transport in *E.coli* (ANRAKU, 1968) dissoziieren vergleichsweise sehr leicht von ihrem Substrat.

Wenn auch der ermittelte Wert von 1,25 für das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm auf Grund der geringen Ausbeute an P_1 (pro Versuch 110-180 γ) mit Zurückhaltung interpretiert werden muß, so läßt sich doch mit einem gewissen Grad an Wahrscheinlichkeit sagen, daß es sich um zwei bis fünf Moleküle gebundenes Adenin pro Polypeptidmolekül handeln sollte, wenn man das Berechnungsverfahren von LAYNE (1957) zugrunde legt (s. S. 42). Auf einen solchen Sachverhalt - Bindung von unterschiedlichen Mengen Adenin - könnte auch die inhomogene Verteilung der Radioaktivität in den VAP-Fractionen 52-64 (Abb. 17) hinweisen, während die Verteilung von P_1 in diesen Fractionen gleichmäßig erscheint.

SONNENBICHLER und NOBIS (1968) haben bei der Isolierung von - damals noch als "Residualproteine" bezeichneten - Eiweißkörpern an Chromatin fixierte Proteine aufgefunden, die beim Abbau der DNS mit DNase (EC 3.1.4.5.) in Lösung gehen, aber noch fest gebundene Nucleotide tragen. Diese Bindung ließ sich

weder im CsCl-Gradienten noch mit 8 M Harnstoff lösen. Auch KLEINSMITH und ALLFREY (1969) berichten von Phosphoproteinen aus Kalbsthymus-Kernen, an die - entsprechend dem Absorptionsverhältnis 260 nm/280 nm - 5-12 % Nukleinsäure so fest gebunden sind, daß es ihnen nicht gelang, die Komponenten zu trennen. In diesem Zusammenhang ist auch eine Gegenüberstellung der Aminosäurezusammensetzung interessant; die in beiden Fällen außergewöhnlich hohe Prozentsätze an sauren und basischen Aminosäuren aufweisen (zusammen 51,9 Mol% bei Ascites-P₁ bzw. 45,2 Mol% bei Phosphoproteinen aus Kalbsthymus), wie sie sonst nicht einmal bei ribosomalen Proteinen (bis zu 43,8 Mol%; siehe TRAUT et al., 1967) oder Histonen (bis zu 38,7 Mol%; siehe JOHNS, 1967) anzutreffen sind.

	Phosphoproteine aus Kalbsthymuskernen (Kleinsmith u. Allfrey, 1969)	Polypeptid P ₁ aus Ascites
	Mol%	Mol%
Glu	14,9	20,0
Lys	9,4	19,7
His	1,9	1,0
Arg	8,5	3,6
Asp	10,5	7,6
Thr	3,8	6,7
Ser	10,3	6,3
Pro	6,2	9,8
Gly	6,8	5,7
Ala	6,2	4,8
Cys	0,6	(nicht bestimmt)
Val	4,5	1,9
Met	1,9	0,0
Ile	3,0	3,9
Leu	6,2	4,6
Tyr	2,4	(0,5)
Phe	2,8	2,5
	99,9 %	100,2 %

Beide Arbeitsgruppen schreiben derartigen Proteinen eine Rolle im räumlichen Aufbau des Chromatins und der Steuerung der Transkription zu - Eigenschaften, die sich möglicherweise nur in geringem Maße auf das Polypeptid P_1 beziehen lassen, wenn auch eine gewisse Bindung an Chromatin vorliegen könnte: Im Verlaufe der Untersuchungen konnte eine erhöhte Ausbeute an P_1 bei höherer Ionenstärke des Extraktionsmediums (0,3 M NaCl) festgestellt werden. Auch GOODWIN und JOHNS (1971) empfahlen kürzlich, Zellkerne nicht mehr mit 0,14 M NaCl-Lösung zu extrahieren, sondern mit 0,35 M NaCl, um eine totale Entfernung adsorbierter Kernsaftproteine aus dem Chromatin zu gewährleisten, und dadurch eine echte Charakterisierung von fest gebundenen Histonen und "non-histone proteins" zu ermöglichen. Dieser Weg wurde aber nicht beschritten, da unter diesen Bedingungen z.T. auch "leicht lösliche" Histone in Lösung gehen (s. S. 51).

Ferner soll hier an die Isolierung eines Nuklease-Inhibitors aus dem Kernsaft von Rattenleber bzw. -Hepatomzellen erinnert werden, die SHAPOT, CHUDINOVA, KRECHETOVA und PUSHKINA (1971) beschrieben haben. Dabei handelt es sich um ein globuläres Protein mit ähnlichem Löslichkeitsverhalten wie P_1 aus Ascites, was Extraktionsbedingungen und Fällung mit Ammoniumsulfat betrifft. Es zeigt ausgezeichnete Inhibitoreigenschaften gegenüber DNasen wie RNasen - ein Phänomen, das einen Hinweis auf die besondere Beschaffenheit des aktiven Molekülbereichs liefern könnte.

Zieht man eine vergleichbare Funktion für P_1 in Betracht, etwa in der Weise, daß das an P_1 gebundene Adenin als Nucleosid in 3'-Stellung phosphoryliert und über eine zweite Phosphatgruppe in 5'-Stellung an das Peptid gebunden sein könnte (also eine homöopolare Bindung), so wäre diese Gruppierung gegen den Angriff eines Großteils von Nukleasen resistent und könnte durch eine etwaige Bindung an eine Nuklease deren aktives Zentrum blockieren. Denkbar erscheint auch die Möglichkeit, daß sich die Adeningruppierung an P_1 mit einer entsprechenden Base an einer Nukleinsäure paart und auf diese Weise die Einwirkung

von Nukleasen verhindert, die ja sowohl im Zellkern als auch im zytoplasmatischen Bereich vorkommen.

Nicht zuletzt wäre an einen enzymatisch aktiven Eiweißkörper zu denken, dessen prosthetische Gruppe Adenin, Oligo-A oder entsprechende Nukleotide enthält.

Zukünftige Untersuchungen werden diese Hypothesen zu klären haben.

MATERIAL UND METHODEN

Allgemeines:

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Fa. Merck, Darmstadt, in analysenreiner Qualität bezogen.

Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser angesetzt. Alle Arbeiten werden bei $0-5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

1) Gewinnung von Yoshida-Ascites-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeiten wurden Sprague-Dawley-Ratten mit Yoshida-Ascites freundlicherweise von Prof. Dr. Ruhenstroth-Bauer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, zur Verfügung gestellt.

Aus der Bauchhöhle dieser Tiere wurde mit einer Injektionspritze Ascitesflüssigkeit entnommen und in Portionen zu 0,1 bis 0,5 ml (durchschnittlich 0,4 ml) weiteren Ratten intraperitoneal injiziert.

Nach 6-8 Tagen konnten aus einer Ratte ca. 40 ml Ascites-Zellsuspension mit etwa 10 g Zellen (Feuchtgewicht) gewonnen werden (zu diesem Zeitpunkt wurde auch auf weitere Tiere überimpft). Pro Versuch wurden 4-6 Ratten verwendet.

Nach durchschnittlich 13 Tagen hatte sich eine derart große Menge von Flüssigkeit in der Bauchhöhle und an Stoffwechselprodukten angesammelt, daß die Tiere starben.

2) Präparation von Zellorganellen aus Yoshida-Ascites-Zellen bzw. Rattenleber

0,9 % NaCl-Lösung ("Physiologische Kochsalzlösung")

2,4 M Saccharoselösung (Ampullenqualität der Fa. Merck)

0,25 M Saccharoselösung mit 1 mM Mg Cl_2 = hypotonisches Medium

0,32 M Saccharoselösung mit 1 mM Mg Cl_2 = isotonisches Medium

Homogenisator Typ Potter-Elvehjem (Thomas, Philadelphia), 30 ml, Teflonstempel, weiter Spalt

Homogenisator Typ Emanuel-Chaikoff (Microchemical Specialties Co., Berkeley, Calif.), 100 ml
Gewebepresse (Harvard App., Co. Inc., Millis, Mass.) aus rostfreiem Stahl

a) Isolierung von Ascites-Kernen

Lit.: EMANUEL und CHAIKOFF (1957)
CHAUVEAU, MOULÉ and ROUILLER (1956)

4-6 männliche Sprague-Dawley-Ratten (ca. 180 g schwer) wurden am 7. oder 8. Tag nach der Übertragung von Yoshida-Ascites durch Genickschlag getötet.

Die Ascitesflüssigkeit wurde schnell aus der Bauchhöhle entnommen und sofort 1:1 mit eisgekühlter Physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um ein Verklumpen zu verhindern.

Die Zellen wurden bei 700 g abzentrifugiert und anschließend mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator vorsichtig in der NaCl-Lösung resuspendiert. Nach einer weiteren Waschung in dieser Form wurde das Zellsediment in hypotonischer Saccharoselösung suspendiert und nochmals abzentrifugiert.

Nach erneutem Resuspendieren in hypotonischem Medium wurden die gequollenen Asciteszellen in einem vorgekühlten Homogenisator Typ Emanuel-Chaikoff aufgeschlossen: Unter hohem Druck - mittels einer hydraulischen Laborhandpresse - wurde die Suspension zweimal durch die Ringdüse des Homogenisators (Aufbau s. Abb. 21) bei 17 μ Spaltweite gepreßt.

Anschließend wurden die restlichen ganzen Zellen im Homogenat durch schnelles Beschleunigen auf 700 g in einer Kühlzentrifuge abgeschleudert (evtl. wiederholt).

Die Kerne wurden durch Zentrifugation bei 700 g viermal mit 0,32 M Saccharoselösung (isotonisch) gewaschen und anschließend im Phasenkontrastmikroskop bei 500-facher Vergrößerung auf Verunreinigungen kontrolliert. Präparationen mit mehr als 5 % ganzer Zellen wurden nicht weiter verwendet.

Emmanuel - Chaikoff - Homogenisator

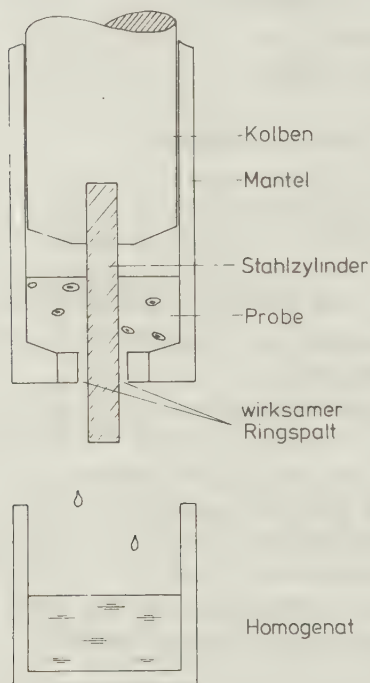


Abb. 21 Homogenisator nach Emanuel und Chaikoff (schematisch)

b) Isolierung von Leber-Kernen

Lit.: POGO, ALLFREY, MIRSKY (1966)

Die Präparation wurde im wesentlichen nach dem von Chauveau et al. (1956) vorgeschlagenen Schema durchgeführt - modifiziert nach Pogo et al. (1966). An Stelle gepufferter Saccharose-lösungen wurden aus den angeführten Überlegungen heraus (S. 9) u n g e p u f f e r t e verwendet, wie bei POGO et al. beschrieben.

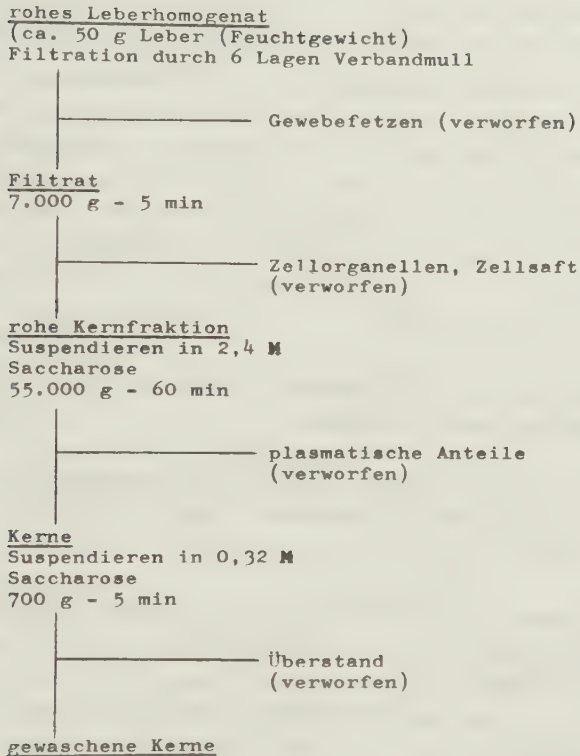


Abb. 22 Präparationsschema für Rattenleberkerne

Für jeden Versuch wurden die Lebern von 4-6 Sprague-Dawley-Ratten (männlich, ca. 180 g), die 48 Stunden gehungert hatten, entnommen und in eisgekühlter 0,32 M-Saccharoselösung gewaschen. Anschließend wurden sie in der Gewebepresse aus rostfreiem Stahl zerkleinert und in 2 Vol. 0,32 M-Saccharoselösung suspendiert. Größere Gewebefetzen wurden durch Filtrieren durch 6 Lagen Verbandmull entfernt.

Diese Suspension wurde mit einem motorgetriebenen (150 UpM) Potter-Elvehjem-Homogenisator mit 10 Auf- und Abwärtsbewegun-

gen homogenisiert und im Verhältnis 1:3 weiterverdünnt. Kerne, ganze Zellen und größere Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert.

Das Pellet wurde vorsichtig mit 2,4 M-Saccharoselösung verrührt und anschließend im Festwinkelrotor Typ 30 in der präparativen Ultra-Zentrifuge (Spinco L-2, -50 B oder L-50, Beckman Instruments) zentrifugiert: Hierbei sedimentieren Leberkerne auf Grund ihrer höheren spezifischen Dichte; die übrigen Zellbestandteile, die teilweise flottieren, werden verworfen. Die auf diese Weise isolierten Kerne wurden vor ihrer weiteren Verarbeitung mit 0,32 M Saccharose gewaschen.

c) Isolierung der "Mirosomen"-Fraktion und von freien Ribosomen aus Ascites-Zellen

Lit.: de DUVE, PRESSMAN, GIANETTO, WATTIAUX, APPELMANS (1955)
BIELKA, WELFLE, BÖTTGER, FÖRSTER (1968)
STAHN (1969)

"Mikrosomen" und freie Ribosomen wurden aus dem rohen Homogenat von Asciteszellen isoliert, das nach der oben beschriebenen Methode hergestellt worden war (Emanuel-Chaikoff-Homogenisator; s.S. 65). Nach Abzentrifugieren der Kerne wurde eine weitere Fraktionierung nach dem von de DUVE et al. (1955) vorgeschlagenen Differentialzentrifugationsprinzip durchgeführt. Eine Behandlung des Ribosomenpräparats mit Na-Desoxycholat unterblieb.

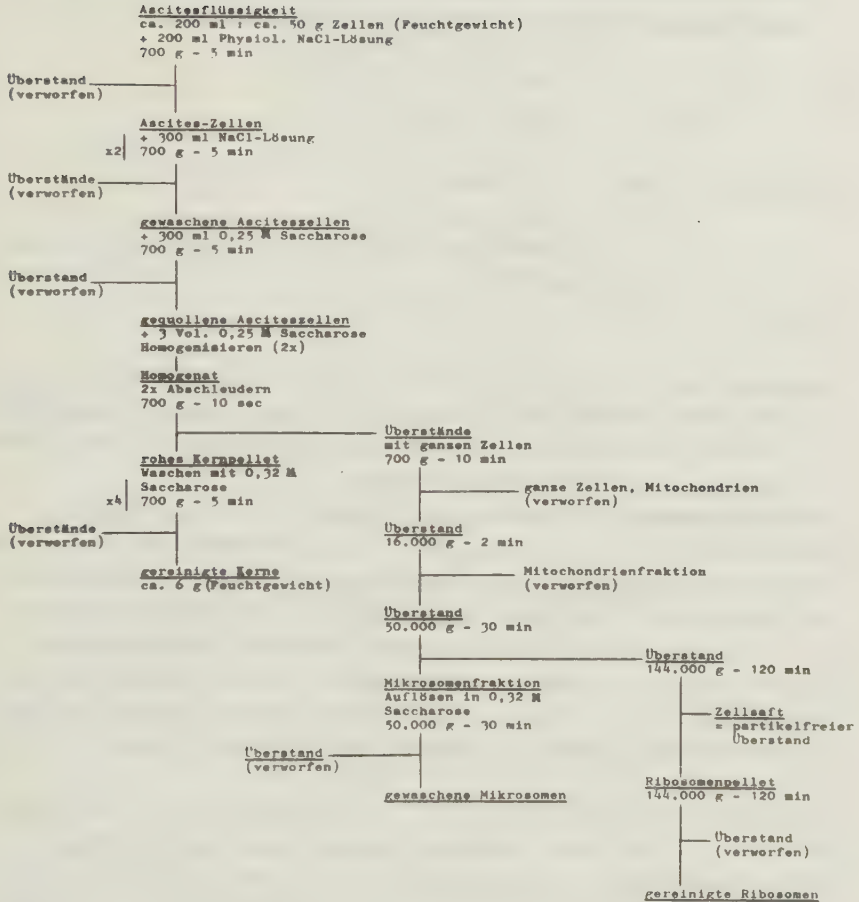


Abb. 23 Präparationsschema für Zellorganellen aus
Yoshida-Ascites

3) Präparation einer "Polypeptidfraktion" aus Zellorganellen und Cytosol von Yoshida-Ascites und Rattenleber

Lit.: KEIL-SORMOVÁ (1965)

SCHWEIGER und HANNIG (1968)

Extraktionspuffer: 0,14 M NaCl

1 mM $MgCl_2$

10 mM Tris-Puffer, mit HCl auf pH 8,5 eingestellt

Aceton

Zellkerne aus Yoshida-Ascites-Zellen (ca. 10 g Feuchtgewicht) und aus Leber wurden jeweils mit 2 Portionen Extraktionspuffer (2 x 45 ml) vorsichtig homogenisiert, Mikrosomen und Ribosomen analog dazu mit jeweils 20 ml Puffer.

Größere Bestandteile wurden gegebenenfalls aus den Suspensionen durch niedertouriges Zentrifugieren entfernt. Nach einer weiteren hochtourigen Zentrifugation bei 144.000 g wurde ein "partikelfreier Überstand" erhalten, der als Ausgangsmaterial für alle folgenden Schritte diente. Wenn der partikelfreie Extrakt direkt aus dem Gesamthomogenat - also ohne vorherige Präparation von Organellen - hergestellt wurde, waren die Gewebe bereits in Extraktionspuffer homogenisiert worden.

Mit dieser Ausgangslösung, die noch niedermolekulare lösliche Bestandteile der Zelle enthielt, wurde eine fraktionierte Fällung mit Aceton durchgeführt nach dem auf Seite 67 angegebenen Schema.

Die bei 63-78 % Acetonkonzentration (entsprechend 1 Vol. Polypeptidlösung + 3,5 Vol. Aceton) ausgefällten Proteine wurden in Kammerpuffer (s.u.) aufgelöst und weiter verwendet.

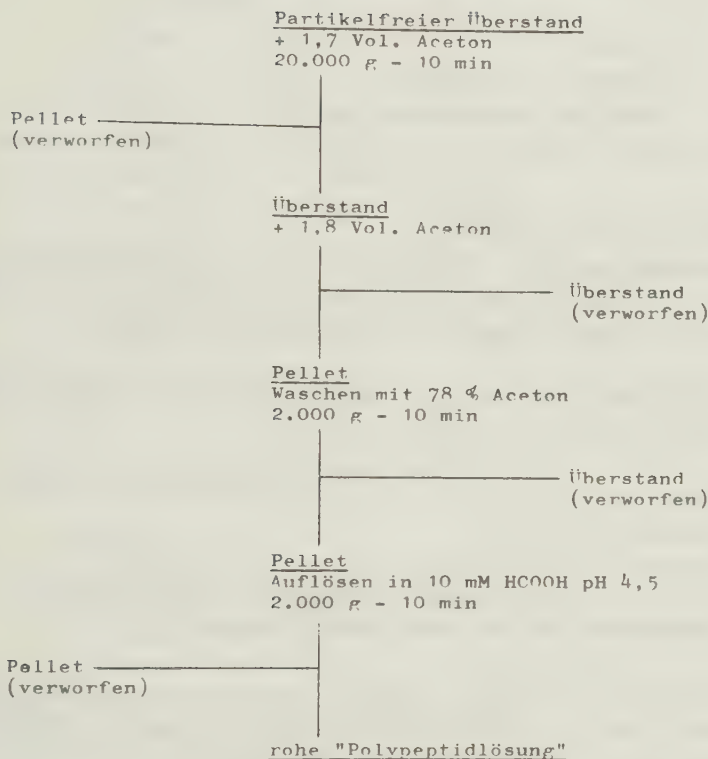


Abb. 24 Präparation einer angereicherten Polypeptidlösung
für die trägerfreie Elektrophorese

4) Auftrennung der durch Acetonfällung gewonnenen rohen
"Peptidfraktion" in der trägerfreien Elektrophorese

Lit.: HANNIG (1964)

Die Trennung wurde in der trägerfrei und kontinuierlich arbeitenden Elektrophoreseapparatur nach HANNIG (Modell VAP II,

Fa. Bender & Hobein GmbH, München) durchgeführt.

Technische Daten:

Effektive Breite der Trennkammer: 355 mm

Effektive Länge der Trennkammer: 425 mm

Fraktionierung: 96 Fraktionen im Abstand von 3,6 mm

Angewandte Trennbedingungen:

Als Kammerpuffer diente eine Lösung von 10 mM Ammoniumformiatlösung, mit Ammoniak auf pH 4,5 bzw. 8,5 eingestellt. In einigen Fällen wurde dieser Lösung 4,0 M Harnstoff zugesetzt.

Als Elektrodenpuffer wurde 15-fach konzentrierter Kammerpuffer verwendet - ohne jeden weiteren Zusatz.

Feldstärke: 60 V/cm

Kammertemperatur: 3° C

Pufferdurchsatz: 190 ml/h

Pro Stunde wurden 2-3 mg aufzutrennendes Material gelöst in 2 ml Kammerpuffer in die Trennkammer eingespritzt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden in einem Zeiss PMQ-2-Spektralphotometer im UV-Bereich gemessen, polypeptidhaltige Fraktionen vereinigt und an einer Gefriertrocknungsapparatur (Virtis, Gardiner, N.Y.) getrocknet.

5) Gelfiltration an Bio-Gel P10-Material

Lit.:

Bio-Rad Materialien

Bio-Gel P10, 100-200 mesh (Bio-Rad, Gräfelting)

Säulenrohr: 400 x 18 mm mit Glasfritte

Elutionspuffer: 0,15 M Ameisensäure mit NH_4OH auf pH 4,5 eingestellt

Durchfluß: auf etwa 30 ml/h eingestellt

Auftragsvolumen: 1,5 ml (gefriergetrocknete VAP-Fraktionen

Das Polyacrylmateriale Bio-Gel P10 ist - laut Herstellerangabe - für Trennungen im Molekulargewichtsbereich von 5-17.000 geeignet: die Ausschlußgrenze liegt bei etwa 12.000.

Das Trennmateriale wurde in Elutionspuffer suspendiert, kurz stehen gelassen, bis der Hauptanteil der Gelkörner sich abgesetzt hatte, die noch freischwebenden "fines" wurden abgegossen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

Bei der Füllung der Säule wurde ein Verlängerungsrohr aufgesetzt. Anschließend wurde Puffer bis zur Hälfte eingefüllt und darauf die Gelsuspension eingebracht. Nachdem die Gelpackung ca. 20 cm hoch stand, wurde der Auslauf der Säule in zunehmendem Maße geöffnet, je weiter sich die Füllung ausbildete.

Vor Beginn einer Trennung wurde die Säule über Nacht unter den späteren Elutionsbedingungen äquilibriert.

6) Analytische Diskelektrophorese

Lit.: ORNSTEIN (1940)

GEESTELAND und STAEHELIN (1967)

LEBOY, COX and FLAKS (1964)

UV-Lampe

Stromgeber mit stabilisiertem Stromfluß

Glasröhrchen (7 x 100 mm)

Substanzbedarf: 1-100 µg Protein

Lösungen für das Trenngel:

1) 48 ml n-KOH

17,2 ml Eisessig

4,0 ml TEMED (Serva, Heidelberg)

48 g Harnstoff;

mit aqua bidest auf 100 ml auffüllen

2) 13,3 g Acrylamid reinst (Serva, Heidelberg)

0,2 g Bis reinst (Serva, Heidelberg)

48 g Harnstoff; ad 100 ml

- 3) 1,12 g Ammoniumperoxidisulfat
48 g Harnstoff; ad 100 ml

Lösungen für das Sammelgel:

- 1) 48 ml n-KOH
2,88 ml Eisessig
0,46 ml TEMED
48,0 g Harnstoff; ad 100 ml

- 2) 5,0 g Acrylamid
1,25 g Bis
48 g Harnstoff; ad 100 ml

- 3) 2 mg Riboflavin
48 g Harnstoff; ad 100 ml

- 4) 48 g Harnstoff; ad 100 ml

Elektrodenpuffer: 31,2 g β -Alanin

8 ml Eisessig; ad 5 l; pH 4,5

In ein senkrecht stehendes Glasröhrchen wurde ein Gemisch der Trenngellösungen 1, 2 und 3 im Verhältnis 1:6:1 nach dem Auflösen von 0,5 mg $K_3Fe(CN)_6$ pro 8 ml Gel eingefüllt und mit Wasser vorsichtig überschichtet.

Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das überstehende Wasser abgesaugt (ohne die Gel-Grenzfläche zu beschädigen). Anschließend wurde eine 1 cm hohe Schicht aus einem Gemisch der Sammelgellösungen 1', 2', 3' und 4' im Verhältnis 1:4:1:2 eingefüllt, mit Wasser überschichtet, und für 10 Minuten im UV-Licht photopolymerisiert.

Bis zu 0,2 ml der proteinhaltigen Probe wurden in dichter Saccharose- oder Harnstofflösung auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 5 mA/Gelröhrchen (Kathode unten) bei Raumtemperatur durchgeführt und nach 2 Stunden beendet.

Nach dem Lauf wurden die Gele aus den Glasröhrchen herausgelöst und für 2-3 Stunden in die Farbfixierlösung nach KUNTZ (1972)

eingelegt, die sich zusammensetzt aus

90 Teilen 20 % TCA in Wasser + 10 Teilen 227 ml Methanol

46 ml Eisessig, 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva),
227 ml H_2O .

Die Stäbchen wurden mit Wasser, das häufig gewechselt wurde,
entfärbt, bis proteinfreie Gelbereiche farblos erschienen.

Die Extinktion angefärbter Proteinbanden wurde in einem
Chromoscan -Densitometer (Joyce-Loebl, Gateshead,
England) bei 580 nm registriert.

7) Split-Gel-Methode (Diskelektrophorese)

Lit.: TRAUT, MOORE, DELIUS, NOLLER, TISSIÈRES (1967)

Gerät und Trennbedingungen: s. unter 6) "Diskelektrophorese".

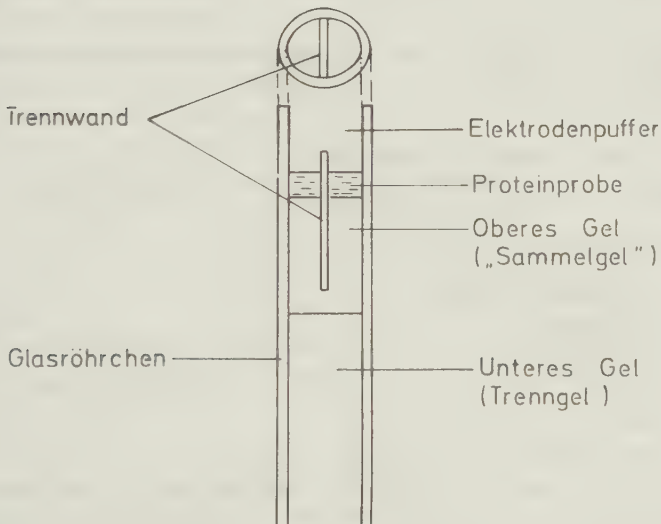


Abb. 25 Schnitt durch ein split-gel-Diskröhrchen

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Modifizierung der oben beschriebenen Diskelektrophorese. Dabei wird das Sammelgel des pH 4,5-Systems durch Einpolymerisieren einer Trennwand aus Weichplastik o.ä. in zwei Hälften aufgeteilt, die zwei verschiedene Proteinproben aufnehmen können.

8) Molekulargewichtsbestimmung mit der SDS-Methode im PAA-Gel

Lit.: WEBER und OSBORN (1969)
SWANK und MUNKRES (1971)

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Polypeptiden wurde ein eigenes System (a) entwickelt, sowie das System von SWANK u. MUNKRES (1971) (b) angewandt.

Bei beiden Verfahren wurden die Proteinproben vor der Elektrophorese bei 37° C für 2 h reduziert und denaturiert in einer Lösung zusammengesetzt aus 1 % SDS, 8 M Harnstoff, 1 % β -Mercaptoäthanol (p.A. Serva) in 0,01 M Phosphorsäure-Tris-Puffer von pH 7,0. Als "marker" und Referenzsubstanz wurde jeder Proteinprobe Bromphenolblau beigegeben.

Gerät: s. unter "Diskelektrophorese"

Substanzbedarf: 1-100 γ Protein

System a:

Lösungen für das Trenngel:

1) 25 g Acrylamid

0,2 g SDS

0,2 M H_3PO_4

2,5 g Bis

36 g Harnstoff;

mit Tris auf pH 7,0 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

2) 0,3 ml TEMED

36 g Harnstoff; ad 100 ml

Die Lösungen 1, 2 und 3 wurden im Verhältnis 2:1:1 gemischt und in Glasröhrchen (7 x 100 ml) 70 mm hoch eingefüllt.

Lösungen für das Sammelgel:

1) 10 g Acrylamid

2,5 g Bis

0,2 M H_3PO_4

0,2 g SDS

36 g Harnstoff;

mit Tris auf pH 8,5 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

2) 1 mg Riboflavin

36 g Harnstoff; ad 100 ml

3) 40 μ l TEMED

36 g Harnstoff; ad 100 ml

Die Lösungen 1, 2 und 3 wurden im Verhältnis 2:1:1 gemischt und als Sammelgel 10 mm hoch auf das Trenngel aufgetragen; anschließend wurde unter der UV-Lampe photopolymerisiert.

Elektrophoresepuffer: 1 g SDS

0,01 M Phosphorsäure;

mit Tris auf pH 6,8 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Die Elektrophorese wurde für 5 h bei Raumtemperatur durchgeführt (Anode unten). Der Stromfluß pro Gelröhrchen wurde auf 8 mA begrenzt.

System b:

Polyacrylamidgele enthielten entsprechend der Originalvorschrift 0,1 % SDS (w/v), 0,075 % TEMED (v/v), 0,1 M H_3PO_4 , und 8 M Harnstoff (mit Tris auf pH 6,8 eingestellt). Der angegebene Prozentgehalt für Ammoniumperoxidisulfat in Höhe von 0,07 % wurde auf 1/3 herabgesetzt, da unter den Bedingungen der

Originalvorschrift vorzeitige, unkontrollierte Polymerisation der Gelbestandteile eintritt.

Die Elektrophorese (Anode unten) wurde bei 4 mA/Gelstäbchen für 20 h durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer Färbelösung (Weber u. Osborn, 1969) bestehend aus 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 227 ml Wasser, 227 ml Methanol und 46 ml Eisessig, für 3 Stunden gefärbt.

Daran schloß sich eine Entfärbung in 875 ml Wasser + 50 ml Methanol + 75 ml Eisessig an, bis proteinfreie Gelbereiche völlig entfärbt erschienen.

9) Bestimmung des isoelektrischen Punkts

a) In der LKB-Säule

Lit.: neuere Literatur bei REIS und WETTER (1970)

Vorschrift der Fa. LKB, Bromma, Schweden

LKB Ampholine Ampholyte pH 5-8 (batch 28)

LKB 8101 Ampholine Elektrofokussierausrüstung (Säule mit 110 ml
Fassungsvermögen)

Stromgeber für stabilisierte Gleichspannung

Substanzbedarf: 0,5 - 5 mg Protein

Anodenflüssigkeit:

0,2 ml Schwefelsäure

12 g Saccharose

14 ml Wasser

Kathodenflüssigkeit:

0,2 ml Äthanolamin

10 ml Wasser

"Dichte" Lösung für den Saccharose-Ampholyt-Gradienten:

3,75 ml Ampholine

39 ml Wasser

28 g Saccharose

"Leichte" Lösung für den Saccharose-Ampholyt-Gradienten:

1,25 ml Ampholine

59 ml Wasser

In die LKB-Säule wurde mit Hilfe eines dünnen Schlauches von oben her die Anodenflüssigkeit eingefüllt. Der Saccharose-gradient mit den Ampholyten wurde anschließend aus einzelnen Fraktionen (aus "dichter" und "leichter" Lösung kombiniert, s.o.) abnehmender spezifischer Dichte aufgebaut und vorsichtig mit der Kathodenflüssigkeit überschichtet.

Zu Anfang der Fokussierung wurde eine Spannung von 300 V angelegt und während der folgenden Stunden auf 500 V gesteigert. Dabei wurden 2 W Gesamtleistung nicht überschritten. Die Temperatur wurde auf $+2^{\circ}$ C gehalten.

Nach 44 Stunden wurde die Fokussierung abgebrochen, der Säulinhalt fraktioniert und die Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 280 nm gemessen. Die pH-Werte der Fraktionen wurden an einem pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen) auf 2 Dezimalstellen genau bestimmt.

b) Bestimmung des isoelektrischen Punkts im PAA-Gel

Lit.: HAYES and WELLNER (1969)

AWDEH (1969)

Stromgeber für stabilisierte Gleichspannung

UV-Lampe

Diskelektrophoresegerät

Substanzbedarf: 1-100 μ g Protein

Anodenflüssigkeit: 0,2 % Schwefelsäure

Kathodenflüssigkeit: 0,4 % Äthanolamin

Gellösungen:

- A) 40 % Ampholine-Ampholyte pH 6-8 (batch 35)
- B) 10 g Acrylamid
340 mg Bis
0,08 ml TEMED; ad 100 ml
- C) 10 mg Riboflavin in 100 ml Wasser

Zusammensetzung des Acrylamidgel-Gemisches:

0,5 ml Lösung A

6 ml Lösung B

0,25 ml Lösung C

0,5 ml Proteinprobe in Wasser

2,75 ml Wasser

Das Gemisch wurde 9,5 cm hoch in Glasröhrchen (7 x 100 mm) eingefüllt und im UV-Licht für 10 min polymerisiert.

Zu Beginn der Fokussierung wurden 80 V Spannung angelegt und allmählich auf 350 V gesteigert. Es wurde darauf geachtet, daß die elektrische Leistung nicht mehr als 0,2 W/Gel betrug. Nach 6-8 Stunden wurde die Fokussierung beendet, und ein Teil der Gelstäbchen in Farblösung nach AWDEH (0,2 % Bromphenolblau, 50 Teile Äthanol, 45 Teile Wasser, 5 Teile Eisessig) für eine Stunde gefärbt. Daran schloß sich eine Entfärbung in Äthanol-Wasser-Eisessig wie 30:65:5 an, bis Proteinbanden blau auf gelblichem Hintergrund sichtbar waren.

Andere Diskstäbchen wurden unmittelbar nach der Fokussierung in gleichmäßig dicke Scheibchen geschnitten. Diese wurden in Reagenzgläsern mit je 1 ml Wasser für 1 Stunde eluiert. Anschließend wurden die pH-Werte der Elutionslösungen bestimmt. Zur genaueren Ermittlung der proteinhaltigen Fraktionen wurden diejenigen Fraktionen für eine Diskelektrophorese verwendet, die nach Maßgabe der angefärbten Gelstäbchen Protein enthalten sollten.

10) Aminosäureanalyse

Lit.: MOORE, SPACKMAN and STEIN (1958)
KREJCI und MACHLEIDT (1969)

Apparat: Aminosäure-Autoanalyzer-Entwicklung des Physiologisch-
Chemischen Instituts der Universität München

Säule: Aminex MS Q50 (Bio-Rad, Gräfelting)

(250 bzw. 50 cm Kapillarsäulen; 0,5 mm Ø)

Substanzbedarf: 2 nM Aminosäurehydrolysat (total) in 5-50 µl
0,2 m Natriumcitratpuffer pH 2,20

Die Proteinprobe wurde in üblicher Weise vorbereitet: Flüchtiger Ammoniumformiatpuffer wurde aus der Proteinlösung durch Gefrier-trocknung entfernt. Anschließend wurde mit 1 ml 6 n-HCl (unter Vakuum eingeschmolzen) für 22 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde in einem evakuierten Exsikkator mit NaOH als Trocknungsmittel entfernt. Darauf wurde das Hydrolysat in Citratpuffer gelöst und zusammen mit Norleucin als Standard auf die Trennsäulen aufgetragen.

11) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Lit.: NEUHOFF, von der HAAR, SCHLIMME und WEISE (1969)

NEUHOFF, WEISE und STERNBACH (1970)

Mikropolyamidplatten beidseitig beschichtet (DC-Fertigfolie
F 1700 der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel)

Dansylaminosäuren (Serva, Heidelberg)

Dansylierungsmittel: 6 mg Dansylchlorid (Serva) in 1 ml Aceton

Lösungen:

0,2 M NaHCO₃ in Wasser; mit Na₂CO₃ auf pH 9 eingestellt

6 n Salzsäure

50 % Pyridin in Wasser

Äthylacetat, wassergesättigt (obere Schicht)

Laufmittel:

I) 1,5 % Ameisensäure

II) Benzol-Eisessig wie 9:1

III) Äthyllessigester-Methanol-Eisessig wie 20:1:1

Durchführung der Bestimmung:

- 1) 0,02 - 0,1 nM Polypeptid werden in 15 μ l NaHCO_3 -Puffer aufgelöst (Schütteln!)
- 2) Eintrocknen im Heizexsikkator bei 60° C über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{NaOH}$ (Vakuumpumpe!): 10 min
- 3) + 15 μ l Wasser: + 15 μ l Dansylchloridlösung; mit Parafilm verschließen
- 4) 2-3 Stunden bei 37° C im Dunkeln reagieren lassen
- 5) im Heizexsikkator bei 60° C eintrocknen
- 6) mit 100 μ l 6n-HCl unter Vakuum einschmelzen und für 4 Stunden bei 110° C hydrolysieren
- 7) Salzsäure einrotieren; Rückstand mit 20 μ l wassergesättigtem Äthylacetat extrahieren und Extrakt in anderes Reagenzglas umfüllen; eindampfen
- 8) in 1-2 μ l 50 % Pyridin auflösen; mit Kapillare punktförmig in eine Ecke einer 3 x 3 cm großen Polyamidplatte auftragen (auf der Rückseite das Referenzgemisch aus Dansylamino-säuren)
- 9) in Laufmittel I bis zum oberen Rand laufen lassen; im Warmluftstrom trocknen
- 10) in Laufmittel II um 90° gekippt bis zum oberen Rand laufen lassen (+ 2 Minuten länger!); trocknen
- 11) in Laufmittel III analog Laufmittel II laufen lassen; trocknen

Im UV-Licht erscheinen Dansylaminosäureflecke grünlich bis gelblich leuchtend auf dunklem Untergrund, Dansylhydroxid bläulich.

12) RNS-Bindung an isolierte Polypeptide in vitro

Lit.: BRAY (1960)

SCHWEIGER und HANNIG (1971)

^3H -RNS (65,8 uc/mg) von der Fa. Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J., USA

Infrarotlampe

Scintillationsflüssigkeit: 0,4 % PPO (= 2,5-Dimethyloxazol) +
0,01 % dimethyl-POPOP (= 1,4 Bis-
[2-(4-methyl-5-phenyl)oxazolyl]benzol
in Toluol

Cellulosenitrat-Membranfilter Typ 85/1, Porenweite 0,45 μ m,
23 mm Durchmesser
(Schleicher & Schüll, Dassel)

Trägernutsche (23 mm Durchmesser)

Inkubationsmedium: 1 mM Na-EDTA
0,5 mM β -mercaptoäthanol
30 mM Tris, mit Salzsäure auf pH 8,5 einge-
stellt .

Gefriergetrocknetes Protein wurde in 1 ml Tris-Puffer gelöst
(40-50 γ /ml) und mit 5 γ 3 H-markierter RNS gemischt. Nach 15
Minuten Inkubation im Eisbad wurde die Probe langsam durch eine
Cellulosenitrat-Membran (in einer Nutsche) gesaugt. Die Membranen
wurden anschließend mit 2 ml Trispuffer gespült, unter einer
Infrarotlampe getrocknet, und in je 10 ml Scintillationsflüssig-
keit überführt.

Die Radioaktivität des an die Filter gebundenen Materials wurde
in einem Tricarb Scintillation Spectrometer (Packard) bestimmt.
Als Blindwert ergab sich für diese Versuchsanordnung 2-3 %
der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität.

13) Bindung von Nukleinsäurevorstufen an Polypeptide in vivo

Lit.: SCHWEIGER und HANNIG (1968)

a) Orotsäure

Physiologische Kochsalzlösung

Orotsäure -6- 14 C (60,8 mc/mM) von Radiochemical Centre,
Amersham, England

Bray-Lösung: 60 g Naphtalin

4 g PPO (= 2,5 Dimethyloxazol)

0,2 g Dimethyl-POPOP (= 1,4-Bis [2-(4-methyl-5-phenyl)oxazolyl] benzol)

100 ml Methanol

20 ml Äthylenglycol; Dioxan ad 1 l

In 2 ml NaCl-Lösung wurden 0,05 mc Radioaktiv markierte Orotsäure gelöst. Je 0,5 ml davon wurden insgesamt 4 Ratten am 8. Tag nach der Überimpfung von Yoshida-Ascites intraperitoneal gespritzt.

Nach 4 h wurden die Tiere getötet, und aus den Asciteszellen die "Peptidfraktion" isoliert (wie in Material und Methoden 1) - 5) beschrieben). Nach der Trennung dieses Materials in der trägerfreien Elektrophorese wurde jeweils 1 ml der Fraktion mit 10 ml Bray-Lösung gemischt, und die Radioaktivität in einem Tricarb Scintillation Spectrometer (Packard) gemessen.

b) Guanin bzw. Adenin

Lit.: WHITE, HANDLER, SMITH (1964)

Guanin-8-¹⁴C, 55 mc/mM (Radiochemical Centre, Amersham, England)

Adenin-8-¹⁴C, 59 mc/mM (Radiochemical Centre, Amersham, England)

Physiologische Kochsalzlösung

Bray-Lösung (s. unter a))

Am achten Tag nach der Überimpfung von Yoshida-Ascites wurden 4 Ratten insgesamt 25 μ c ¹⁴C-Guanin bzw. ¹⁴C-Adenin (in 1 ml Physiologischer Kochsalzlösung) intraperitoneal gespritzt. Nach zwei Stunden wurden die Tiere getötet, Ascitesflüssigkeit entnommen und die "Peptidfraktion", wie oben beschrieben, isoliert.

Jeweils 1 ml der VAP- bzw. Bio-Gel-Säulenfraktionen wurden wieder mit 10 ml Bray-Lösung gemischt und die Radioaktivität in einem Tricarb Scintillation Spectrometer (Packard) bestimmt.

c) Isotopenverdünnungsversuch

Lit.: SCHÜTTE (1966)

OLDHAM (1971)

Adenin p.A., synth. (Serva, Heidelberg)

Adenin-8- ^{14}C , 59 mc/mM (Radiochemical Centre, Amersham, England)

Bray-Lösung

Physiologische Kochsalzlösung

Alle Versuchsbedingungen entsprachen den unter 13b) beschriebenen; zusätzlich zu markiertem Adenin wurde ein 50-facher Überschuß von nicht radioaktivem Material injiziert.

d) Autoradiographie bei diskelektrophoretischen Verfahren

Lit.: MAURER (1968)

JOHN und MILLER (1964)

Adenin-8- ^{14}C , 59 mc/mM, von Radiochemical Centre, Amersham,
England

Diskelektrophoresegerät (s. unter 2))

Fotografische Emulsion: Eastman-Kodak-Stripping-film AP-10-Platte

Entwickler: Dektol, von Eastman-Kodak

Fixierbad

Mit Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbte Diskstäbchen wurden ausgiebig mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend der Länge nach sorgfältig in zwei Hälften geschnitten. (Auf ebene Schnittflächen wurde hierbei geachtet).

Bei völliger Dunkelheit wurden die Stäbchenhälften mit der Planfläche auf die beschichtete Seite der Fotoplatte gelegt. Darüber wurde eine Glasplatte gelegt und mit Klebstreifen befestigt, die guten Kontakt zwischen Gel und Emulsion gewährleisten sollte. Das Ganze wurde in selbsthaftende Haushaltsfolie eingeschlagen, in schwarzes Papier gewickelt und in einem dicht schließenden Karton bei 4°C aufbewahrt.

Exposition: 96 h

Entwicklung (nach vorsichtigem Ablösen der Gelhälften): in
Dektol für 5 Minuten bei 18° C

Wässern: 30 Sekunden

Fixieren: in saurem Fixierbad für 10 Minuten bei 18° C

Anschließend ausgiebig wässern in destilliertem Wasser;
trocknen.

14) Elektronenmikroskopie

Lit.: REIMER (1967)

STAHN (1969)

Glutaraldehyd

Osmiumtetroxid, 1 %ig in Wasser

Uranylacetat, 2 %ig in Wasser

Bleicitrat nach Reynolds, rein (Serva, Heidelberg)

Phosphatpuffer, 0,01 M; pH 7,4

Propylenoxid

Epon (Serva, Heidelberg)

aufsteigende Alkoholreihe

Ultramikrotom Typ Ultratome 4802 A (LKB, Bromma, Schweden)

Zellkerne wurden für 5 Minuten bei 700 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend für 2 Stunden in 4 % Glutaraldehyd fixiert und mit häufig gewechseltem Phosphatpuffer frei von Glutaraldehyd gewaschen. Nach einer einstündigen Nachfixierung mit Osmiumtetroxid wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Daran schlossen sich Zwischenstufen von Propylenoxid bzw. Propylenoxid-Epon (1:1) an. In reinem Epon wurden die Proben für 40 Stunden bei 60° C im Trockenschrank polymerisiert.

Nach ca. einer Woche wurden die Eponblöcke mit dem Ultramikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in Uranylacetat und für 5 Minuten in Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem JEM-T7-Elektronenmikroskop (Jeol, Tokio) hergestellt.

15) Proteinbestimmung

Lit.: LOWRY, ROSEGROUCH, FARR, RANDALL (1951)

WRIGLEY und WEBSTER (1968)

Rinderserumalbumin, 98 %ig, krist. (Serva, Heidelberg) als
Standard

Lösungen:

- 1) 20 % TCA in Wasser
- 2) 20 g Na_2CO_3
0,5 g Natriumtartrat
100 ml 1n-NaOH; ad 1000 ml
- 3) 1,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l Wasser
- 4) Folin-Reagenz = 1 Teil Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu +
1 Teil Lösung 2 (frisch bereitet)

Die Proteinprobe wurde mit dem gleichen Volumen 20 % TCA versetzt und in Eis gestellt. Nach 30 Minuten wurde das Praecipitat bei 2000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgegossen.

Das Pellet wurde in 0,5 ml Wasser aufgelöst, anschließend 2,5 ml Lösung 4 dazugegeben und gemischt. Nach 10 Minuten (bei Raumtemperatur) wurden 0,25 ml Lösung 3 dazugegeben und gemischt. Nach 30 Minuten wurden die Proben bei 750 nm gemessen.

Routinemessungen bzw. Messungen an Proteinmaterial, das nicht mit TCA fällbar ist (s. S. 17), wurden nach der Methode von WRIGLEY und WEBSTER durchgeführt, die eine Extinktion der Probe bei 220 nm messen. Dabei entsprechen 0,20 mg Rinderserumalbumin/ml/cm (in Wasser) einer Extinktion von 1,8. Damit war es möglich, niedrige Proteinkonzentrationen auch in Gegenwart von Nukleotiden o.ä. mit relativ guter Genauigkeit zu bestimmen.

Bei 220 nm folgt die Absorption von Protein dem Lambert-Beer'schen Gesetz bis zu dem Wert 2,0 und ist weitgehend unabhängig vom pH in einem Bereich von 3-11.

ZUSAMMENFASSUNG

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurden Bedingungen zur Präparation von Zellkernen aus Yoshida-Ascites-Zellen ermittelt.
- 2) In der Fraktion der löslichen Kernproteine (Nukleosol) dieser Kerne konnte ein Polypeptid nachgewiesen werden, das in vivo in Anwesenheit von 8-¹⁴C-Adenin radioaktiv markiert wird. Dagegen werden andere Purin- oder Pyrimidinbasen und markierte Ribonukleinsäure offensichtlich weder in vivo noch in vitro unter den angewandten Bedingungen gebunden. Das markierte Adenin(-derivat) ist relativ fest an die Protein-komponente gebunden; es konnte u.a. in Lösungen mit 8 M Harnstoff nicht abgetrennt werden.
- 3) Es gelang, dieses Polypeptid aus dem Nukleosol wie auch aus dem Cytosol durch fraktionierte Fällung mit Aceton anzureichern. Eine weitere Reinigung wurde durch Auftrennung in der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophorese und anschließende Gelfiltration an Bio-Gel P10 in präparativem Maßstab möglich. Das isolierte Material (P₁) war zu 85-90 % rein.
- 4) Das Polypeptid P₁ erwies sich als einheitlich in der analytischen Diskelektrophorese bei pH 4,5, in der SDS-Diskelektrophorese, in der Isoelektrischen Fokussierung, und in Bezug auf die N-terminale Aminosäure. Sein Molekulargewicht konnte hierbei mit $10.500 \pm 3\%$ und sein isoelektrischer Punkt mit $7,23 \pm 0,05$ bestimmt werden.
- 5) Bei der Aminosäureanalyse fällt ein hoher Gehalt an Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und Prolin auf. Methionin fehlt ganz. Als N-terminale Aminosäure wurde Glycin bestimmt.
- 6) Das Polypeptid P₁ konnte auch in der "Mikrosomen"-Fraktion nachgewiesen werden. Hierbei dürfte es sich jedoch um ad-

sorbiertes Material handeln, nicht aber um eine Strukturkomponente der Membranen.

In Ribosomen konnte es nicht nachgewiesen werden.

- 7) Aus dem Nukleosol von Rattenleberkernen konnte ein Polypeptid (P_1') isoliert werden, das in einigen Punkten (Verhalten während der Präparationsschritte, in der analytischen wie in der SDS-Diskelektrophorese) deutliche Übereinstimmungen mit dem Ascites-Polypeptid P_1 zeigt. Die Aminosäureanalyse weist dagegen deutliche Abweichungen auf.
- 8) Für die Molekulargewichtsbestimmung von Polypeptiden nach der SDS-Methode wurde ein neues System beschrieben. Hierbei bewirkt die zusätzliche Verwendung eines Sammelgels (mit pH-Sprung) eine Schärfung der Peptidzonen, die in das Trenngel einwandern.

Auf Grund einiger Eigenschaften könnte das isolierte Polypeptid P_1 den Phosphoproteinen zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich auch um einen Nuklease-Inhibitor, dessen "aktives Zentrum" (Adenin?) sich entweder mit Nukleasen verbindet und sie auf diese Weise blockiert, oder über eine Basenpaarung mit Nukleinsäure deren Abbau verhindert.

Das Polypeptid P_1 könnte ferner enzymatische Aktivität besitzen: in diesem Falle würde das gebundene Adenin oder Adenin-derivat vielleicht als prosthetische Gruppe wirken.

LITERATURVERZEICHNIS

Anraku, Y.,

J.Biol.Chem. 143, 3123 (1968)

Awdeh, Z.L.,

Science Tools, The LKB Instrument Journal 16, 42 (1969)

Baltimore, D. and Huang, A.S.,

J.Mol.Biol. 47, 263 (1970)

Bielka, H., Welfle, H., Böttger, M. and Förster, W.,

Europ.J.Biochem. 5, 183 (1968)

Bio-Rad-Materialien S/D'68

Bours, J., and van Doorenmaalen, W.J.,

Science Tools, The LKB Instrument Journal 17, 36 (1970)

Bray, J.A.,

Anal.Biochem. (New York) 1, 279 (1960)

Cartouzou, G., Poiree, J.C. and Lissitzky, S.,

Europ.J.Biochem. 8, 357 (1969)

Chauveau, J., Moulé, S. and Rouiller, C.,

Exp.Cell Res. 11, 317 (1956)

Dounce, A.L. and Ickowicz, R.,

Arch.Biochem.Biophys. 131, 359 (1969)

Dunker, A.K. and Rueckert, R.R.,

J.Biol.Chem. 244, 5074 (1969)

de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and

Appelmans, F.,

Biochem.J. 60, 604 (1955)

Emanuel, C.F. and Chaikoff, I.L.,

Biochim.Biophys.Acta 24, 254 (1957)

Geesteland, R.F. and Staehelin, T.,

J.Mol.Biol. 24, 149 (1967)

Girard, M. and Baltimore, D.,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 56, 999 (1966)

Glossmann, H. und Lutz, F.,

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 1583 (1970)

Goodwin, G.H. and Johns, E.W.,

FEBS Letters 21, 103 (1972)

- Gray, W.R. and Hartley, B.S.,
Biochem.J. 89, 379 (1963)
- Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 338, 211 (1964)
- Harbers, E. and Vogt, M.,
The cell nucleus metabolism and radiosensitivity, S. 165
Taylor & Francis, London, 1966
- Hayes, M.B. and Wellner, D.,
J.Biol.Chem. 244, 6636 (1969)
- Herp, A., Liska, M., Payza, N., Pigman, W. and Vittek, J.,
FEBS Letters 6, 321 (1970)
- Hjerten, S., Jerstedt, S. and Tiselius, A.,
Biochem. 11, 219 (1965)
- Huang, R.C. and Bonner, J.,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 54, 90 (1965)
- Jentsch, J.,
Naturw.Rdsch. 25, 68 (1972)
- John, D.W. and Miller, L.L.,
Federation Proc. 23, 523 (1964)
- Karlson, P.,
Dtsch.med.Wschr. 86, 668 (1961)
- Karlson, P.,
Wirkungsmechanismen der Hormone, Springer, Berlin, 1967
- Karlson, P.,
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Thieme, Stuttgart, 1970
- Karlson, P. und Sekeris, C.E.,
Acta Endocrinol. 53, 505-518 (1966)
- Keil, B. und Sormová, Z.,
Handbuch der biochemischen Laboratoriumstechnik,
Geest & Portig K.-G., 1965
- Kleinsmith, L.J. and Allfrey, V.G.,
Biochim.Biophys.Acta 175, 123 (1969)
- Krejci, K. und Machleidt, W.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 981 (1969)
- Krüsmann, W.F. und Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 342, 161 (1968)

Kuntz, G.,

Inaugural-Dissertation an der Universität München, 1972

Laiko, M.T., Ruoslahti, E.I., Papermaster, D.S. and

Dreyer, W.J.,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67, 120 (1970)

Layne, E.,

in S.P. Colowick and N.O. Kaplan "Methods in Enzymology"

Vol. 3, S. 447; Academic Press, N.Y., 1957

Lazarus, H. and Sporn, M.,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 57, 1386 (1967)

Leboy, P.S., Cox, E.C. and Flaks, G.,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 52, 619 (1964)

Maurer, H.R.,

Disk-Elektrophorese, de Gruyter & Co., Berlin, 1968

Moore, S. and Stein, W.H.,

J.Biol.Chem. 211, 893 (1954)

Moore, S., Spackman, D.H. and Stein, W.H.,

Anal.Chem. 30, 1185 (1958)

Neuhoff, W., von der Haar, F., Schlimme, E. und Weise, M.,

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 121 (1969)

Neuhoff, V., Weise, M. und Sternbach, H.,

Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 351, 1395 (1970)

Nilsson, P., Wadström, T. and Vesterberg, O.,

Biochim.Biophys.Acta 221, 146 (1970)

Oldham, K.G.,

Anal.Biochem. 44, 143 (1971)

Ornstein, L.,

Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321 (1964)

Patel, G., and Wang, T.Y.,

Exptl. Cell Res. 34, 120 (1964)

Penman, S.,

J.Mol.Biol. 17, 117 (1966)

Pogo, A.O., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E.,

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 56, 550 (1966)

Porath, J. and Flodin, P.,

Nature 183, 1657 (1959)

- Potter, V.R. and Elvehjem, C.A.,
J.Biol.Chem. 114, 495 (1936)
- Reimer, L.,
Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparations-
methoden, Springer, Berlin, 1967
- Reis, H.E. und Wetter, O.,
Klin.Wschr. 48, 643 (1970)
- Samarina, O.P., Krichevskaya, A.A., and Georgiev, G.P.,
Nature 210, 1319 (1966)
- Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Molnar, J. and Georgiev, G.P.,
J.Mol.Biol. 33, 251 (1968)
- Samec, J., Jacob, M. and Mandel, P.,
Biochim.Biophys.Acta 161, 377 (1968)
- Sarkar, S.,
Z.Naturforschg. 21b, 1202 (1966)
- Schneider, W.C. and Kuff, E.L.,
J.Biol.Chem. 244, 4843 (1969)
- Schütte, H.R.,
Radioaktive Isotope in der organischen Chemie und Biochemie
S. 140 ff., Verlag Chemie, Weinheim, 1966
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 1005 (1967)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 943 (1968)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Biochim.Biophys.Acta 204, 317 (1969)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Biochim.Biophys.Acta 254, 255 (1971)
- Schweiger, A. und Spitzauer, P.,
zur Publikation angenommen bei Biochim.Biophys.Acta, 1972
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. and Maizel, J.V.,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 815 (1967)
- Shapot, V.S., Chudinova, I.A., Krechetova, G.D. and Pushkin, I.,
FEBS Letters 13, 13 (1971)
- Sonnenbichler, J. und Nobis, P.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 1556 (1968)
- Spirin, A.S. and Nemer, M.,
Science 150, 214 (1965)

- Spirin, A.S.,
Europ.J.Biochem. 10, 20 (1969)
- Stahn, R.,
Dissertation an der Universität München (1969)
- Swank, R.T. and Munkres, K.D.,
Anal.Biochem. 39, 462 (1971)
- Traut, R.R., Moore, P.B., Delius, H., Noller, H. and
Tissières, A.,
Biochemistry 57, 1294 (1967)
- Vallejo, C.G. and Lagunas, R.,
Anal.Biochem. 36, 207 (1970)
- Vesterberg, O. and Svensson, A.,
Acta Chem.Scand. 20, 820 (1966)
- Wang, T.Y. and Johns, E.W.,
Arch.Biochem.Biophys. 124, 176 (1968)
- Weber, K. and Osborn, M.,
J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969)
- White, A., Handler, P. and Smith, E.L.,
Principles of Biochemistry, III. Edition 1964, MacGraw-Hill
Book Company, New York
- Yphantis, D.A.,
Ann.N.Y.Acad.Sci. 88, 586 (1960)

Lebenslauf

Ich wurde am 10. Februar 1944 in Neuburg an der Donau geboren, als Sohn von Josef Spitzauer†, Volksschullehrer, und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Schütze.

Am gleichen Ort besuchte ich von 1950-1954 die Volksschule, anschließend von 1954-1963 das Humanistische Gymnasium.

Nach dem Abitur im Jahre 1963 studierte ich Biologie, Chemie und Genetik an der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Im Sommer 1967 begann ich die Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Hannig.

Am 28.5.1971 heiratete ich die Volksschullehrerin Dorothee Bieder.

